

REGULATION
DER AKTIN-POLYMERISATION
DURCH AKTIN-ÄHNLICHE
PROTEINE: IHRE
BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG,
IMMUNOLOGISCHE VERWANDTSCHAFT
UND GENOMISCHE ORGANISATION

Wiebke Knoerzer





Digitized by the Internet Archive
in 2026

REGULATION DER AKTIN-POLYMERISATION
DURCH AKTIN-ÄHNLICHE PROTEINE:
IHRE BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG,
IMMUNOLOGISCHE VERWANDTSCHAFT UND
GENOMISCHE ORGANISATION

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Wiebke Knoerzer
Hamburg

Juli 1986

1. Gutachter: Prof. Dr. C. David
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Bandlow
Sondergutachter: Dr. G. Isenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 9.10.1986

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1983 bis Juli 1986 am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in Martinsried durchgeführt.

Herrn Dr. Gerhard Isenberg danke ich herzlich für die Anregung und wissenschaftliche Unterstützung zu dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. C. David für die Betreuung und Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich der Biologie.

Mein Dank gilt auch Hiroshi Maruta für die gute Zusammenarbeit, sowie die Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Thomas Schreckenbach möchte ich herzlich für die mir entgegengebrachte freundschaftliche Hilfe und Unterstützung bei der Lösung Physarum-spezifischer Probleme danken.

Meinem Kollegen Michael Schleicher bin ich für die intensiven fachlichen Diskussionen dankbar, die ich mit ihm im Laufe meiner Arbeit führen konnte.

Seiner Frau Angelika Noegel danke ich für zahlreiche experimentelle Hilfestellungen, die ich für meine Arbeit verwerten konnte.

Herrn Prof. Dr. C. Fulton und seiner Frau Dr. E. Lai bin ich zu großem Dank verpflichtet. Ihre konstruktive Unterstützung und Freundschaft hat entscheidend zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen.

Meinem Kollegen Werner Nader danke ich für die Bereitstellung der LAMBDA-gt11-Physarum-c-DNA-Genbank, sowie für viele interessante und hilfreiche Diskussionen.

Gudrun Kausel und Toni Dischner ist es zu verdanken, daß die Arbeit die vorliegende Form bekam.

Abkürzungen

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
ci	Curie
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
CTP	Cytosintriphosphat
DEP	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
<u>E.coli</u>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GTP	Guanosintriphosphat
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
^{125}J	radioaktives Jodisotop mit der Massenzahl 125
IgG	Immunglobulin der Klasse G
kb	Kilobasen
kd	Kilodalton
M	molar
MG	Molekulargewicht
NP40	Nonidet NP40, Ethylphenylpolyethylenglykol
^{32}p	radioaktives Phosphorisotop mit der Massenzahl 32
PEG 6000	Polyethylenglykol, MG 6000
pfu	plaque forming unit
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
poly A	Polyadenylsäure
PPO	Diphenyloxazol
psi	pounds pro inch ²
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Boten-RNA
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
^{35}S	radioaktives Schwefelisotop mit der Massenzahl 35
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethan
TTP	Thymintriphosphat
u	unit
X-Gal	5-bromo-3 indolyl- β -galactosid

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG	1
1. Struktur und Funktion des Zytoskeletts	1
2. <u>Physarum polycephalum</u> als Modell-organismus zum Studium von Zytoskelettproteinen	8
3. Aktin-Multigenfamilie in <u>Physarum</u>	11
4. Zielsetzung der Arbeit	12
B. MATERIAL UND METHODEN	14
1. Material	14
1.1 Chemikalien	14
1.2 Enzyme	14
1.3 Sonstige Materialien	14
1.4 Organismen	15
1.5 Verwendete Aktin-DNA/c-DNA-Genbank	15
2. Kulturbedingungen	15
2.1 Medium für <u>Physarum polycephalum</u> (Daniel und Baldwin, 1964)	16
2.2 Medien für <u>E.coli</u>	16
2.2.1 LB-Medium (Luria Bertani)	16
2.2.2 Ergänzungen zum LB-Medium	16
2.3 Medien für die Aufbewahrung und Verdünnung von Phagen	17
2.4 Züchtung von Mikroplasmoiden	17
2.5 Aufbewahrung von <u>E.coli-Kulturen</u>	17
3. Allgemein verwendete Puffer	18
4. Elektrophoresen	19
4.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	19
4.2 Zweidimensionale Protein-Gele (2D-Gele)	19
4.3 Nichtdenaturierende Agarosegele zur Auftrennung von DNA	20
4.4 Denaturierende Acrylamid-Sequenzgele	20
5. Limitierte Proteasespaltungen	21
5.1 Limitierte Subtilisinspaltung	21
5.2 Limitierte Trypsinspaltung	21
6. Immunologische Methoden	21
6.1 Herstellung von Antiseren gegen Aktin-ähnliche Proteine	21
6.2 Anreicherung der IgG-Antikörper	22
6.3 Radioimmunoassay	22
6.4 Immunoblotting (modifiziert nach Towbin et al., 1979)	23
6.5 Isolierung von Polysomen aus <u>Physarum</u> (nach Jeffery, 1982)	23
6.6 Säulenchromatographische Auftrennung von Polysomen	25

6.6.1	Protein-A-Sepharose (nach Taylor und Tse, 1976)	25
6.6.2	DNaseI-Agarose	25
6.6.2.1	Kopplung der DNaseI an das Säulenmaterial	25
6.6.2.2	Anreicherung spezifischer Polysomen über eine DNase I-Agarosesäule	26
7.	In vitro-Translation	26
8.	Genetische Methoden	27
8.1	Präparation hochmolekularer genomischer <u>Physarum</u> -DNA	27
8.1.1	Isolierung von <u>Physarum</u> -Zellkernen (nach Mohberg und Rusch, 1971)	27
8.1.2	Isolierung chromosomaler DNA aus <u>Physarum</u>	27
8.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.	28
8.3	Hybridisierung filtergebundener Nukleinsäuren	29
8.3.1	Transfer von DNA auf Nitrocellulose (Southern et al., 1975)	29
8.3.2	Hybridisierung und Waschen der Filter	29
8.3.3	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	30
8.3.3.1	Nick-Translation	30
8.3.3.2	Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase	30
8.4	LAMBDA gt10 Klonierung	30
8.4.1	Präparation der Vektor-DNA	30
8.4.2	Präparation der Insert-DNA	30
8.4.3	Ligation und in vitro-Verpackung	31
8.4.4	Plattierung rekombinanter Klone	31
8.4.5	Identifizierung rekombinanter Klone	32
8.5	Präparation von LAMBDA-DNA	33
8.5.1	LAMBDA-DNA-Minipräparation	33
8.5.2	LAMBDA-DNA-Isolierung im großen Maßstab (LAMBDA gt11/LAMBDA gt10)	34
8.6	Herstellung transformationskompetenter Zellen	35
8.7	Subklonierung mit Plasmid pGem2	35
8.7.1	Präparation der Plasmid-DNA	35
8.7.2	Ligation und Transformation des rekombinanten Plasmids	36
8.7.3	Plattierung und Identifizierung transformierter Bakterien	36
8.8	Plasmid-DNA-Isolierung	36
8.8.1	Plasmid-DNA-Minipräparation nach der "boiling"-Methode (Holmes, 1981)	36
8.8.2	Präparative Plasmid-DNA-Isolierung (Holmes, 1981)	37
8.9	Sequenzierung nach der Didesoxy-Sanger- Methode (1979)	37
8.9.1	Subklonierung mit M13-RF-DNA	37
8.9.2	Sequenzierungsreaktion	39

C. ERGEBNISSE

1.	Biochemische Charakterisierung der Aktin- Bindungsproteine aus <u>Physarum polycephalum</u>	40
1.1	Gelelektrophorese	40
1.2	Limitierte Proteasespaltungen	43

2.	Immunologische Charakterisierung der Aktin-Bindungsproteine aus <u>Physarum polycephalum</u>	45
2.1	Kreuzreaktivität mit heterologen anti-Aktinseren	45
2.2	Kreuzreaktivität mit Antiseren gegen Aktin und Aktin-Bindungsproteine aus <u>Physarum</u>	45
2.2.1	Gewinnung polyklonaler Antikörper	45
2.2.2	Charakterisierung der Antikörperspezifität in Immunoblots	47
2.2.3	Kreuzreaktivität der Antikörper gegen Aktin-Bindungsproteine aus <u>Physarum</u> im RIA	50
2.2.4	Versuche zur Gewinnung monospezifischer polyklonaler Antikörper gegen die Aktin-Bindungsproteine aus <u>Physarum</u>	54
3.	Isolierung einer Aktin-c-DNA aus <u>Physarum</u>	56
3.1	Versuch der Anreicherung spezifischer Aktin-mRNA-Moleküle durch Immunopräzipitation	57
3.1.1	Präparation von Polysomen	57
3.1.2	Immunopräzipitationsexperimente <u>Physarum</u> -DNA	58
3.2	Screening einer LAMBDA gt11- <u>Physarum</u> -c-DNA-Genbank	61
3.2.1	Hybridisierungsbedingungen für die heterologe Seeigel-Aktin-Sonde	61
3.2.2	Das LAMBDA gt11-Vektorsystem	63
3.2.3	Plaquehybridisierung und Aufreinigung eines spezifischen Aktin-c-DNA-Klons	63
3.3	LAMBDA-DNA-Präparation des spezifischen Aktin-Klons	64
3.4	Subklonierung der Aktin-c-DNA aus <u>Physarum</u>	67
3.4.1	Das Klonierungssystem pGem2	67
3.4.2	Ligation von Plasmid- und Insert-DNA und Transfektion kompetenter Zellen mit dem rekombinanten Plasmid	68
3.4.3	Plasmidpräparation transformierter Kolonien	68
3.5	Sequenzierung der klonierten c-DNA nach der Dideoxy-Sanger-Methode (1979)	73
3.5.1	Das M13-Phagen-Vektorsystem	73
3.5.2	Subklonierung der c-DNA in M13-RF-DNA	74
3.5.3	Isolierung und Sequenzierung rekombinanter einzelsträngiger M13-DNA	76
4.	Klonierung Aktin-ähnlicher Sequenzen aus <u>Physarum</u>	81
4.1	Isolierung hochmolekularer genomischer <u>Physarum</u> -DNA	81
4.1.1	Präparation von Kernen aus <u>Physarum</u>	81
4.1.2	Isolierung und Charakterisierung genomischer <u>Physarum</u> -DNA	82
4.2	Southernblotanalysen genomischer <u>Physarum</u> -DNA	84
4.3	Größenfraktionierung genomischer <u>Physarum</u> -DNA	90
4.4	Das LAMBDA gt10-Vektorsystem	90
4.5	Ligation und in vitro-Verpackung von LAMBDA gt10-Vektor-DNA und größenfraktionierter <u>Physarum</u> -DNA	93
4.6	Plaquehybridisierung und Aufreinigung spezifischer LAMBDA gt10-Klone	93
4.7	LAMBDA gt10-DNA-Präparation eines positiven Klons	94
4.7.1	Kartierung des klonierten Inserts	94
4.7.2	Subklonierung in M13 und Sequenzierung	97

D. DISKUSSION	100
1. Biochemische Charakterisierung der F-Aktin-Cappingproteine aus <u>Physarum</u>	100
2. Isolierung der c-DNA eines Aktingens aus <u>Physarum</u>	103
3. Versuche zur Klonierung und Sequenzierung einer Aktin-ähnlichen Sequenz aus <u>Physarum</u>	104
4. Instabilitäten bei der Klonierung genomischer <u>Physarum</u> - DNA	108
E. ZUSAMMENFASSUNG	112
F. LITERATURVERZEICHNIS	115
Lebenslauf	

A. EINLEITUNG

1. Struktur und Funktion des Zytoskeletts

Für die Architektur des Grundzytoplasmas eukaryotischer Zellen ist ein komplexes Netzwerk aus zytoplasmatischen Proteinfilamenten, das sogenannte Zytoskelett, verantwortlich. Es bestimmt die für jeden Zelltyp spezifische Zellform und ist für verschiedene Phänomene der Zellbeweglichkeit verantwortlich (Goldman et al., 1976). Im Inneren der Zelle sind die für eine eukaryotische Zelle typische Kompartimentierung, aber auch intrazelluläre Bewegungen, wie die Zytoplasmaströmung (Korn, 1978), auf eine dynamische Funktion des Zytoskeletts zurückzuführen. Darüberhinaus wird das Zytoskelett für eine mögliche Interaktion zwischen Zellmembran und Zellkern verantwortlich gemacht (Birchmeier, 1984). Weiter wird angenommen, daß auch extrazelluläre Signale von der Zellmembran über das Zytoskelett dem Kern übermittelt werden und im Kern eine entsprechende Antwort auslösen. Es wurde deshalb zum Beispiel ein enger Zusammenhang zwischen der Auflösung des Zytoskeletts in transformierten Zellen und der in diesen Zellen beobachteten Entkopplung von Zellproliferation und Zelldifferenzierung postuliert (Scott et al., 1984).

Das Zytoskelett setzt sich im wesentlichen aus Mikrofilamenten, Mikrotubuli, intermediären Filamenten und den jeweils damit assoziierten Proteinen zusammen.

a) Die intermediären Filamente

Die intermediären Filamente, auch 10 nm-Filamente genannt, stellen eine heterogene Klasse von Proteinen mit Molekulargewichten von 40 - 200 kd dar. Es können fünf Klassen

von intermediären Filamentproteinen charakterisiert werden (Osborn und Weber, 1982): Das Vimentin (MG 55 kd) für die Filamente in Fibroblasten, ein saures Gliafilamentprotein (GFA, MG 53 kd) in Gliazellen, Desmin (MG 52 kd) für die Filamente in Muskelzellen, mindestens drei Proteine mit MG von 70, 150 und 200 kd, welche die Neurofilamente in Neuronen aufbauen und verschiedene Keratine (MG 40 - 70 kd) für die 100 Å Filamente in Epithelzellen. Alle intermediären Filamente zeigen eine weitgehend ähnliche Ultrastruktur. Jedoch stellte sich bei Sequenzanalysen (Quax et al., 1983) heraus, daß Proteine eines Gewebetyps aus verschiedenen Organismen eine höhere Homologie zueinander aufweisen, als Proteine aus unterschiedlichen Filamentklassen desselben Organismus. Die intermediären Filamente stellen die stabilste Komponente des filamentösen Netzwerks dar. Ein Abbau kann nur über spezifische Proteasen erfolgen. Ihre spezifische Funktion konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Vermutlich ist dieser Filamenttyp für die Stabilität und Strukturhaltung der Zelle verantwortlich. Außerdem gibt es inzwischen Hinweise, daß bestimmte Proteine der intermediären Filamente (zum Beispiel Vimentin) mit Mikrotubuli und Mikrofilamenten, den beiden anderen Hauptkomponenten des Zytoskeletts, interagieren (Geiger und Singer, 1980).

b) Die Mikrotubuli

Mikrotubuli entstehen durch Aneinanderlagerung von normalerweise 13 Protofilamenten zu einem hohlen Tubulus (Durchmesser 25 nm). Ein einzelnes Protofilament ist das Ergebnis einer Polymerisation von Tubulinmonomeren, die sich jeweils aus einem ALPHA- und BETA-Tubulinpolypeptid zusammensetzen (MG der ALPHA- bzw. BETA-Tubulinuntereinheiten: 55 kd). Die Aminosäuresequenz und die

physikalischen Eigenschaften der ALPHA- und BETA-Tubuline sind unter allen bisher untersuchten Eukaryoten sehr konserviert. Die Mikrotubuli sind an vielen zellulären Funktionen beteiligt, unter anderem der Mitose (als Teil des mitotischen Spindelapparats), der Zellfortbewegung (als Komponenten der Cilien und Flagellen) und der zellulären Architektur (als Teil des Zytoskeletts) (Dustin, 1984). Im besonderen scheinen die Mikrotubuli an der Positionierung und am intrazellulären Transport verschiedener Organellen mitverantwortlich zu sein. Mikroskopische Untersuchungen lassen eine direkte Assoziation zwischen Organellen, zum Beispiel der synaptischen oder "coated vesicles", und Mikrotubuli vermuten (Imhof et al., 1983).

c) Mikrofilamente

Die Mikrofilamente setzen sich aus G-Aktin-Monomeren mit einem Molekulargewicht von 42 kD zusammen. Die Polymerform entspricht einer doppelsträngigen Helix mit einem Durchmesser von 7 nm. Das Aktinmolekül ist während der eukaryotischen Evolution und Differenzierung hochkonserviert worden. Aminosäuresequenzanalysen konnten eine über 90%ige Homologie unter allen bisher untersuchten Aktinen nachweisen. Beispielsweise unterscheidet sich das Aktin des Säugetierskelettmuskels in nur 6,5% der Aminosäurereste vom zytoplasmatischen Säugetieraktin. Das Aktin des niederen Eukaryoten Physarum polycephalum zeigt sogar eine 93,5%ige Homologie zu Aminosäuresequenzen des Aktins aus Nichtmuskelsäugetierzellen (Vandekerckhove und Weber, 1978b/c, 1979).

Die Aktinfilamente sind an zahlreichen Phänomenen der zellulären Beweglichkeit beteiligt, u.a. an der Muskelkontraktion in der Interaktion mit Myosin (dicke Filamente), der Zytokinese,

Phagozytose und der intrazellulären Zytoplasmaströmung (Remedios und Barden, 1983).

In Muskelzellen kommt das Aktin als stabiles Strukturelement in Form von dünnen Filamenten (F-Aktin) vor. In Nichtmuskelzellen dagegen herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den G-Aktin-Monomeren und dem F-Aktin-Polymer. Da das Zytoskelett lebender Zellen keine statische Struktur ist, sondern sich in einem ständigen Prozeß des Auf- und Abbaus befindet, scheinen neben den Mikrotubuli vor allem die Mikrofilamente dieser dynamischen Funktion des Zytoskeletts gerecht zu werden.

Dekorationsexperimente des Aktinmoleküls mit der schweren Untereinheit des Myosins konnten zeigen (Huxley, 1963), daß das Aktin-Filament zwei strukturell verschiedene Enden besitzt, was unterschiedliche Reaktionskinetiken an diesen beiden Enden zur Folge hat. Für die beiden Enden eines Filaments konnten unterschiedliche Polymerisationsraten mit unterschiedlichen kritischen G-Aktin-Konzentrationen bestimmt werden (Wegner und Isenberg, 1982), die zur Definition eines schnell wachsenden Plus-Endes ("barbed-end") und eines langsam wachsenden Minus-Endes ("pointed-end") führten (Pollard und Mooseker, 1981).

In Nichtmuskelzellen wird der Polymerisationszustand des Aktins entscheidend von Aktin-assoziierten Proteinen bestimmt und reguliert. Es konnten zahlreiche Aktin-Bindungsproteine aus unterschiedlichen Geweben und Organismen isoliert und zum Teil charakterisiert werden (Weeds, 1982). Die Aktin-Bindungsproteine können unterteilt werden in:

a) sogenannte Aktin-sequestrierende Proteine. Diese bilden einen 1:1-Komplex mit G-Aktin-Monomeren (zum Beispiel Profilin). Auf diese Weise kann innerhalb der Zelle ein G-Aktin-Pool aufrecht erhalten werden. Die Polymerisation von freiem G-Aktin in F-

Aktinfilamente ist weitgehend inhibiert.

b) fragmentierende Proteine (zum Beispiel Severin aus Dictyostelium, Fragmin aus Physarum). Die wesentliche Eigenschaft dieser Proteingruppe ist die sehr hohe Affinität zu einem einzelnen Aktin-Monomer sogar innerhalb eines F-Aktin-Filaments. Die Zelle besitzt daher die Möglichkeit, mit Hilfe dieser Proteine bestehende Aktinfilamente in kürzere Filamente umzuwandeln.

c) Proteine, die für die Bündelung oder Vernetzung von Filamenten verantwortlich gemacht werden, zum Beispiel Fimbrin und Filamin (Abb. 1).

Von besonderem Interesse ist eine Gruppe von Proteinen, die an ein Ende des Aktin-Filaments bindet und eine weitere Polymerisation von G-Aktin-Molekülen an diesem speziellen Ende verhindert (Endblockierende Cappingproteine; Isenberg et al., 1980; Isenberg et al., 1985).

Die Aktivität vieler der genannten Aktin-Bindungsproteine ist Calcium-abhängig, so daß ihre Regulation über Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration gesteuert werden kann.

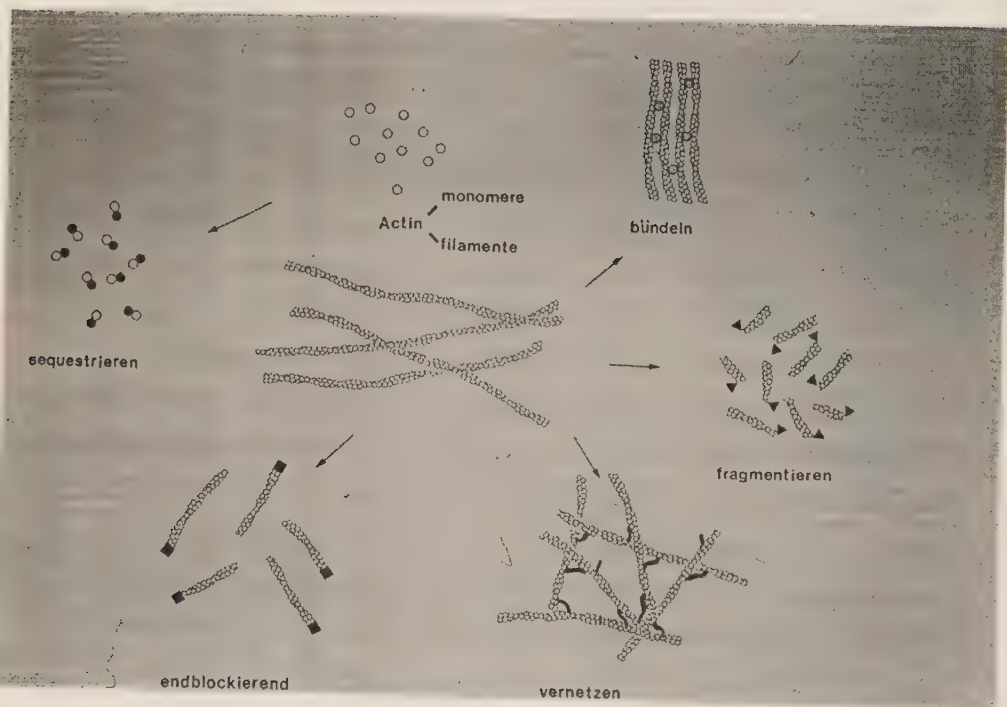


Abb. 1:
Schematische Darstellung möglicher Interaktionen zwischen Aktin und den Aktin-Bindungsproteinen (Isenberg, G. in: Bild der Wissenschaft. 6/86)

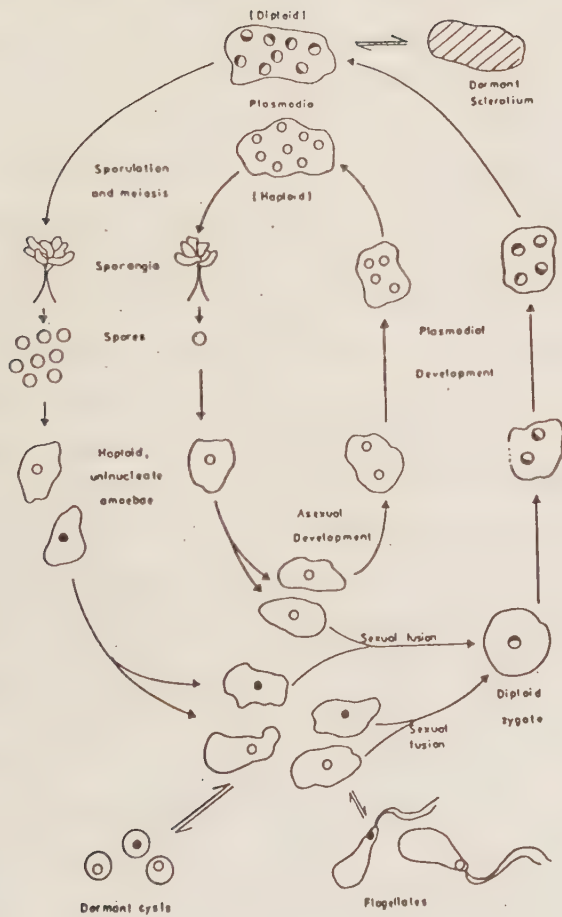


Abb. 2:
Lebenszyklus von *Physarum polycephalum* (Aldrich und Daniel, 1982)

2. Physarum polycephalum als Modellorganismus zum Studium von Zytoskelettproteinen

Physarum polycephalum weist einen geschlossenen sexuellen Lebenszyklus auf (Sauer, 1982). Haploide einkernige Amöben unterschiedlichen Paarungstyps können zu diploiden einkernigen Zygoten fusionieren (Abb. 2). Während des Wachstums der Zygote finden nur noch Kern-, jedoch keine Zell-Teilungen mehr statt. Unter ungünstigen Lebensbedingungen (keine ausreichende Nahrung) stehen dem Organismus zwei Differenzierungswege zur Verfügung, die zur Ausbildung von Dauerstadien führen. Im Dunkeln erfolgt die reversible Sklerotisierung, das heißt die Enzystierung des Plasmodiums. Durch Belichtung wird die Bildung von Fruchtkörpern, den Sporangien, induziert. In diesem irreversiblen Differenzierungsprozeß entstehen nach Durchlaufen meiotischer Teilungen haploide enzystierte Sporen. Der Zyklus schließt sich, wenn aus den Sporen (unter Feuchtigkeit) haploide einkernige Amöben entstanden sind. Sowohl Amöben als auch Plasmodien können in Kultur gehalten werden (Aldrich und Daniel, 1961).

Physarum - Plasmodien weisen zwei besonders interessante biologische Eigenschaften auf: Die 10^6 bis 10^8 Zellkerne pro Plasmodium durchlaufen synchrone Mitosen bei einer Zellzyklusdauer von ca. 8 Stunden. In den Mitose-freien Stadien herrscht eine ausgeprägte Zytoplasmaströmung im Endoplasma der Plasmodien (Wohlfarth-Bottermann, 1979).

Immunofluoreszenzaufnahmen mit anti-F-Aktin- bzw. anti-Myosin-Antikörpern konnten Akto-Myosin-Fibrillen sichtbar machen, die vorwiegend im Ektoplasma des Plasmodiums lokalisiert sind. Kontraktionsvorgänge zwischen Aktin und Myosin werden für die oszillierende Zytoplasmaströmung verantwortlich gemacht, deren Richtung sich alle ein bis zwei Minuten umkehrt. Darüberhinaus

kommt es in den Adern eines Plasmodiums zu ständigen Gel/Sol-Transformationen, das heißt Bestandteile des Ektoplasmas werden jeweils am Ende eines Kontraktionszyklus zu Endoplasma umgewandelt und umgekehrt. Offensichtlich liegen die Grundbausteine des kontraktiven Apparates im Endoplasma in weniger differenzierter Form vor. Es wird vermutet, daß eine regulierte Aktin-Polymerisation und -Depolymerisation den schnellen Wechsel zwischen aktiver und inaktiver Form des kontraktiven Apparates bewirkt. Polymerisierte F-Aktin-Filamente befinden sich hauptsächlich im Ektoplasma (Allera et al., 1971), während das Endoplasma eine höhere Konzentration von G-Aktin-Monomeren enthält. Diese können mit G-Aktin-Antikörpern nachgewiesen werden.

Die Vermutung liegt nahe, daß eine Änderung des Polymerisationsgrades des Aktins durch Aktin-Bindungsproteine reguliert wird. Tatsächlich können Aktin-Bindungsproteine aus Physarum polycephalum isoliert werden: zum Beispiel das Fragmin (Hinssen, 1981a/b; Hasegawa et al., 1980) und das Protein cap42(a+b) (Maruta et al., 1983a-c; 1984a/b). Die Proteine cap42(a) und cap42(b) zeigen sowohl als Einzelpeptide als auch als Komplex cap42(a+b) eine Calcium-abhängige F-Aktin-Cappingaktivität. Fragmin zeigt eine zusätzliche fragmentierende Aktivität.

Die F-Aktin-Cappingproteine aus Physarum bilden einen ternären Komplex, der sich aus Cappingprotein bzw. dem Komplex (a+b), Calcium und G-Aktin zusammensetzt ("capped-G-Aktin"-Modell; Maruta et al., 1984). Unter Gleichgewichtsbedingungen bindet dieser ternäre Komplex an das schnellwachsende Ende eines Aktin-Filaments. Nach erfolgtem "capping" des Filaments ist die Polymerisation am Plus-Ende blockiert und es erfolgt eine Netto-

Depolymerisation am Minus-Ende. Die Depolymerisation kommt erst dann zum Stillstand, wenn die Konzentration an freiem Cappingprotein nicht mehr ausreichend ist, um mit freien Aktin-Monomeren einen 1:1-Komplex zu bilden.

Die Bildung eines ternären Komplexes aus Cappingprotein, Calcium und G-Aktin zeigt neben der Endblockierung des F-Aktins einen weiteren Effekt: das Nukleieren von Aktinfilamenten. Unter Gleichgewichtsbedingungen ist das Heterodimer aus Cappingprotein und G-Aktin stabiler als das normale Aktindimer. Daher ist das Heterodimer gegenüber dem Aktindimer begünstigt, ein weiteres G-Aktin zu binden und somit die Aktin-Filamentbildung zu induzieren.

Das Aktin-Bindungsprotein cap42(b) ist als Phosphoprotein identifiziert worden (Maruta und Isenberg, 1984a). Eine Physpezifische Kinase phosphoryliert cap42(b) in vitro an zwei Threoninresten, nicht jedoch cap42(a), das korrespondierende Peptid des Proteinkomplexes. Der Phosphorylierungsgrad von cap42(b) ist für die Aktivität dieses Aktin-Bindungsproteins von entscheidender Bedeutung. Im phosphorylierten Zustand wird die cap42(b)-Cappingaktivität Calcium-abhängig. Andererseits ist die Phosphorylierung von cap42(b) hemmbar, sobald die intrazelluläre Calciumkonzentration auf Konzentrationen größer als 10^{-7} M ansteigt. Auch der ternäre Komplex aus cap42(a), Calcium und Aktin verhindert eine Phosphorylierung von cap42(b).

Der Befund, daß während der Mitose im Plasmodium für ca. 30 Minuten keine Zytoplasmaströmung stattfindet, konnte auf die Inaktivierung von cap42(a+b) zurückgeführt werden (Shibayama, 1985). Da die Calciumkonzentration während der Mitose unter 10^{-7} M abfällt, kann folglich cap42(b) phosphoryliert werden. Im phosphorylierten Zustand wird cap42(b) Calcium-abhängig und

verliert damit bei diesen niedrigen Calcium-Konzentrationen für die Dauer der Mitose seine Aktivität. Auch die Calcium-abhängigen Proteine Fragmin und cap42(a) liegen bei Calcium-Konzentrationen kleiner als 10^{-7} M in inaktiver Form vor. Aus diesem Grund verlagert sich das Gleichgewicht zwischen G- und F-Aktin auf die Seite des F-Aktins. Es kommt zur Ausbildung des Gelzustandes, der nur noch eine sehr reduzierte Zytoplasmaströmung zuläßt.

3. Aktin-Multigenfamilie in Physarum

In Physarum ist eine Aktin-Multigenfamilie mit mindestens vier nicht gekoppelten Genorten gefunden worden (Schedl und Dove, 1982). Auch in anderen Organismen wurden Multigenfamilien für Aktin nachgewiesen: z.B. siebzehn Aktingene in Dictyostelium (Kindle und Firtel, 1978; Firtel, 1979), oder sechs Aktingene in Hefe (Fyrberg et al., 1981). Über mögliche Vorteile einer Multigenfamilie gegenüber nur einer einzigen DNA-Sequenz für die Kodierung wichtiger Strukturproteine sind verschiedene Hypothesen aufgestellt worden (Romans und Firtel, 1985; Lewin, 1983). Es ist denkbar, daß die Feineinstellung der Aktin-mRNA-Transkription durch die Existenz einer Multigenfamilie kontrolliert wird, indem hochkonservierte kodierende Regionen mit unterschiedlich starken Promotoren verbunden werden und somit eine differenzielle Genregulation ermöglichen. Der Vorteil einer Multigenfamilie kann auch darin liegen, daß geringfügige Änderungen der Primärsequenz die Grundlage dafür schaffen, daß spezifische Aktinproteine mit entsprechend unterschiedlichen zellulären Proteinen interagieren können.

4. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die drei in Physarum polycephalum nachgewiesenen F-Aktin-Cappingproteine Fragmin, cap42(a) und cap42(b) näher charakterisiert werden. Dazu sollten unter anderem Gelelektrophoresen, isoelektrische Fokussierung und limitierte Proteasespaltungen durchgeführt werden. Im weiteren waren Untersuchungen zur immunologischen Verwandtschaft der identifizierten Aktin-Bindungsproteine untereinander und mit Aktin vorgesehen. Polyklonale Antikörper gegen die einzelnen Physarum-Proteine sollten im Immunoblot und im Radioimmunoassay auf eventuelle Kreuzreaktivitäten überprüft werden. Die proteinchemischen Untersuchungen der drei Aktin-Cappingproteine sollten Aufschluß darüber geben, ob es sich bei einem der Aktin-Bindungsproteine aus Physarum um eine sogenannte Aktin-Variante handelt. Durch Substitution nur einiger weniger Aminosäuren könnte ein verändertes Aktin entstanden sein, welches die Fähigkeit zur Polymerisation verloren, dafür aber F-Aktin-Cappingaktivität erhalten hat. Es wurde die Hypothese aufgestellt, ob eventuell eines der beschriebenen Aktingene aus Physarum (Schedl und Dove, 1982) für Aktin-ähnliche Proteine kodiert oder ob zusätzliche Aktin-ähnliche Sequenzen in der genomischen DNA gefunden werden können.

Für die Analyse einer möglichen DNA-Sequenzhomologie zwischen einer Aktin-Variante und Aktin sollte eine Physarum-spezifische Aktinsequenz isoliert werden. Dazu sollte aus einer LAMBDA gt11-Physarum-c-DNA-Genbank mit Hilfe der heterologen Seeigel-Aktin-DNA eine Physarum-Aktin-c-DNA aufgefunden und charakterisiert werden. Diese sollte dann in Southernblotanalysen genomischer Physarum-DNA als spezifische molekulare DNA-Sonde eingesetzt

werden. Ziel dieser Studie sollte es sein, auf DNA-Ebene die oben zitierte Hypothese zu untersuchen. Mit größenfraktionierter Physarum-DNA, welche die zusätzlich identifizierte Aktin-ähnliche Sequenz enthielt, sollte eine genomische Physarum-DNA-Unterbibliothek im LAMBDA gt10-Vektor angelegt und daraus mit Hilfe der isolierten Physarum-Aktin-c-DNA rekombinante Klone identifiziert werden. Im Anschluß an die Isolierung spezifischer Aktin-ähnlicher DNA sollten Subklone im Phagen M13 konstruiert werden, um eine Didesoxysequenzierung durchzuführen.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien

1.1 Chemikalien

Acrylamid, Serva; Agar, Difco; Agarose, Seakem; Amberlite MB-1, Biorad; Ampicillin, Sigma; Ampholine, LKB; Bactotrypton, Difco; Bromphenolblau, Serva; Coomassie Brilliant Blue R250, Serva; Cycloheximid, Sigma; Ethidiumbromid, Serva; Hefeextrakt, Difco; Hemin, Sigma; Heparin, Serva; Heringssperma-DNA, Serva; IPTG, Boehringer; Methylenbisacrylamid, Serva; Milchfilter, Dr. Degen; Nukleotide (Desoxy-, Didesoxy-, Ribo-), Boehringer; NP40, Sigma; Polyethylenglycol 6000, Serva; Polyadenylsäure (PolyA), Sigma; Radiochemikalien, NEN; RNasin (Ribonukleaseinhibitor), Promega; Tween, Sigma; X-Gal, Boehringer; Xylencyanol, Serva.

1.2 Enzyme

DNaseI, Sigma; E.coli DNA-PolymeraseI, Boehringer; Klenow-Fragment, BRL; Lysozym, Serva; Phosphatase, alkalisch aus Kälberdarm, Boehringer; Proteinase K, Boehringer; Restriktionsenzyme: Boehringer, BRL, NEB; RNase H, BRL; RNase T1, Sigma; SP6-RNA-Polymerase, Promega; Subtilisin, Sigma; Trypsin, Sigma; T4-DNA-Ligase, BRL.

1.3 Sonstige Materialien

Affigel 10, Biorad; DE81-Papier, Schleicher&Schuell; DNA: LAMBDA gt10, M13mp19, pGem2, Promega; Freud'sches Adjuvans komplett, Gibco; in vitro-packaging Extrakte, Promega; 3MM-Chromatographiepapier, Whatman; M13-primer, NEB; Nitrocellulose 0,45 um Porengröße, Schleicher&Schuell; Protein A-Sepharose 4B/CL, Pharmacia; Sephadex G50, Pharmacia; folgende Filme wurden

verwendet: Polaroid (Positiv/Negativfilme) PN55 und X-Ray XAR5-Kodakröntgenfilme.

Firmenadressen:

Boehringer, Mannheim.

BRL (Bethesda Research Laboratories), Karlsruhe.

Difco, Detroit, Michigan USA.

Gibco Laboratories, Grand Island Biological Company, NY14072,

USA.

LKB, Bromma, Schweden.

NEB (New England Biolabs), Schwalbach/Taunus.

NEN, Dreieich.

Pharmacia, Freiburg.

Promega Genofit, Genf, Schweiz.

Schleicher&Schuell, Dassel.

Serva, Heidelberg.

Sigma, Deisenhofen.

Whatman, England.

1.4 Organismen

Physarum polycephalum CL: haploider Stamm (Cooke and Dee, 1975), freundlicherweise von Herrn Dr. T. Schreckenbach erhalten.

E.coli-Stämme:

KM 392pMC9 (LMABDA gt11)

JM 109 (pGem2/M13)

C600 hfl A⁻ (LMABDA gt10)

HB 101 (pGem2)

Neuseeland-Kaninchen - weiblich

1.5 Verwendete Aktin-DNA/c-DNA-Genbank

Seeigel-Aktingen pSpG17, 3kbp, kloniert in den Plasmidvektor pBR322 (Durica et al., 1980).

LMABDA gt11-Physarum-c-DNA-Genbank freundlicherweise von Dr. M. Kazarinoff/Dr. W. Nader erhalten, nicht veröffentlicht.

2. Kulturbedingungen

Wenn nicht anders angegeben wurden alle Lösungen autoklaviert und steril aufbewahrt.

2.1 Medium für Physarum (Daniel und Baldwin, 1964)

Wachstumsmedium für 1 l:

Bactotrypton	10,0 g
Hefeextrakt	1,5 g
Glucose	10,0 g
Salzlösung	20,0 ml

pH 4,6 mit KOH eingestellt.

Salzlösung für 500 ml:

Zitronensäure x 1 H ₂ O	16,85 g
Eisenchlorid x 4 H ₂ O	0,25 g
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	2,5 g
Manganchlorid x 4 H ₂ O	0,35 g
Zinksulfat x 7 H ₂ O	0,14 g
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	2,5 g

getrennt gelöst und als letztes zugegeben.

Heminlösung für 200 ml:

Natriumhydroxid	2 g
Hemin	100 mg

autoklaviert und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2 Medien für E.coli

2.2.1 LB-Medium (Luria Bertani)

Für 1 l:

Bactotrypton	10 g
Natriumchlorid	10 g
Hefeextrakt	5 g

2.2.2 Ergänzungen zum LB-Medium

Zur Herstellung von Agarplatten wurde das LB-Medium mit Bactoagar (Endkonzentration 1,5%) versetzt. Für Amp-Platten wurden dem autoklavierten und auf 48°C abgekühlten LB-Medium 50 mg/l Ampicillin zugesetzt.

Top-Agarose:

100 ml LB-Medium wurden mit Agarose (Endkonzentration 0,7%) versetzt. Zur Selektion auf β -Galaktosidase-Aktivität (LAMBDA gt11/M13) wurden der Top-Agarose pro Platte 10 μ l 100 mM IPTG und 50 μ l einer X-Gal-Lösung (20 mg/ml in Dimethylformamid) zugegeben.

Für die Aufzucht und Ausplattierung der rekombinanten Phagen LAMBDA gt11 und LAMBDA gt10 wurde dem LB-Medium sowie der Top-Agarose Maltose (Endkonzentration 0,2%) zugegeben.

2.3 Medien für die Aufbewahrung und Verdünnung von Phagen

SM-Medium für 1 l:

Natriumchlorid	5,8 g
Magnesiumsulfat mit 7 H ₂ O	2,0 g
1 M Tris/HCl, pH 7,5	50,0 ml
2%ige Gelatine	5,0 ml

2.4 Züchtung von Mikroplasmodien

100 ml Wachstumsmedium wurden mit 1 ml Heminlösung versetzt und mit 2,5 ml drei Tage alter Mikroplasmodienkultur angeimpft und mit 150 rpm bei 24°C geschüttelt. Drei Tage nach dem Transfer befand sich die Mikroplasmodienkultur in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase und konnte zur Aberntung der Zellen oder zum erneuten Transfer verwendet werden.

2.5 Aufbewahrung von E.coli-Kulturen

1 ml LB-Medium wurde mit einer Einzelkultur angeimpft, mit 70 μ l DMSO versetzt und bei -70°C aufbewahrt.

3. Allgemein verwendete Puffer

5xTBE Elektrophoresepuffer:

450 mM Tris
440 mM Borsäure
10 mM EDTA pH 8,0

20xSSC:

3 M Natriumchlorid
300 mM Natriumcitrat
pH 7,0 mit NaOH eingestellt

1xTE, pH 8,0:

10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

TDAS:

10 mM Tris/HCl pH 7,5
1 mM DTT
0,02 % Natriumazid
0,44 M Sucrose

NCP-Puffer:

150 mM Natriumchlorid
17,5 mM Natriumphosphat pH 7,2
0,02 % Natriumazid

TTX-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 7,7
150 mM Natriumchlorid
0,02 % Natriumazid
0,1 % TritonX100
0,1 % BSA

5xP-Puffer (modifizierte Denhardt-Lösung):

250 mM Tris/HCl pH 7,5
0,5 % Natriumpyrophosphat
0,5 % SDS
1,0 % BSA
1,0 % PVP
1,0 % Ficoll

10xTEAC:

400 mM Tris
200 mM Natriumacetat
20 mM EDTA
180 mM Natriumchlorid pH 8,05 mit Eisessig eingestellt.

STET-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0
50 mM EDTA
8 % Sucrose
5 % TritonX100

4. Elektrophorese

4.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese von Proteinen wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Acrylamidkonzentrationen der Plattengele (90 x 20 x 1,5 cm, bez. 110 x 83 x 0,5 mm) variierte zwischen 9% und 15%. Die Elektrophorese wurde für 4 Stunden bzw. für 1 Stunde bei konstanter Spannung (150 V) durchgeführt. Zur Anfärbung der Proteine wurde 0,2%iges Coomassie in 30% Methanol und 10% Eisessig verwendet.

4.2 Zweidimensionale Protein-Gele (2D-Gele)

Die isoelektrische Fokussierung von Proteinen wurde nach der Methode von O'Farrell (1975) durchgeführt. Hierfür wurden für die erste Dimension Rundgele (2 mm x 12,5 cm) mit folgender Zusammensetzung angefertigt:

Für 10 ml:

Harnstoff	5,5	g
Acryl/Bisacrylamid (30 : 0,8%)	1,33	ml
10% NP40	2,00	ml
Wasser	1,7	ml
Ampholine pH 5 - 7	0,6	ml
Ampholine pH 3 - 10	0,115	ml

Nach der Messung mit einer pH-Elektrode konnte ein linearer pH-Gradient von 4-9 im Rundgel ermittelt werden. In der zweiten Dimension erfolgte eine Auftrennung nach Molekulargewichten (siehe 4.1).

4.3 Nichtdenaturierende Agarosegele zur Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte in horizontalen 0,4%-1,4%igen Agarosegelen. Das Volumen der Gele betrug 8 und 200 ml, die Elektrophorese der entsprechenden Gele wurde bei 20 V/ 40 mA (8 ml-Volumen) bzw. 40 V/40 mA (200 ml-Volumen) durchgeführt, für die Zusammensetzung des verwendeten Puffersystems Tris/Acetat, 1xTEAC, siehe B.3. Die Anfärbung aufgetrennter DNA-Fragmente erfolgte mit 1 µg/ml Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml). Zur Reduktion des Hintergrundes wurden die Gele anschließend in Wasser entfärbt und unter UV-Licht mit einem Rotfilter fotografiert. Als Filme wurden Polaroid-Positiv/Negativ-Filme verwendet.

4.4 Denaturierende Acrylamid-Sequenzgele

Zur Auftrennung von DNA nach einer Sequenzierungsreaktion wurden Plattengele (20 x 40 x 0,35 cm, Geldicke 0,4 mm) mit folgender Zusammensetzung angefertigt:

Für 40 ml:

Harnstoff	20 g
Acryl/Bisacrylamid (28:2%)	6 ml
10xTBE-Puffer	2 ml
10% APS	0,2 ml
Wasser	16 ml
TEMED	60 µl

Die Auftrennung erfolgte für 1 - 2 Stunden mit 20 mA und 2,5 kV. Anschließend wurde das Gel für 20 Minuten fixiert (10%iger Eisessig und 10%iges Methanol), getrocknet und autoradiographiert (Übernachtexposition).

5. Limitierte Proteasespaltungen

5.1 Limitierte Subtilisinspaltung

In einem Reaktionsvolumen von 15 μ l wurden 5 μ g Protein mit 5 , 10, 20 und 50 ng Subtilisin (1 mg/ml in TDAS-Puffer) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit Probenpuffer gestoppt, bei 100°C für 5 Minuten denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.1).

5.2 Limitierte Trypsinspaltung

In einem Reaktionsvolumen von 50 μ l wurden 30 μ g Protein mit 0,5, 1, 5, 10 und 15 μ g Trypsin (Proteinkonzentration siehe 5.1) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, mit 2 μ l 50 mM PMSF gestoppt, für 5 Minuten bei 100°C denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.1).

6. Immunologische Methoden

6.1 Herstellung von Antiseren gegen Aktin-ähnliche Proteine

Vor jeder Immunisierung wurde den Tieren Blut zur Gewinnung von Präimmuseren entnommen. Erst dann wurden 50 - 100 μ g gereinigtes Antigen pro 300 μ l TDAS-Puffer (denaturiertes cap42(a) bzw. cap42(b), natives cap42(b) und oxidiertes Aktin) mit 300 μ l komplettem Freud'schen Adjuvans gemischt und weiblichen Neuseelandkaninchen mit ungefähr zwanzig Einstichen intradermal in den Rücken der Tiere injiziert. Nach drei bis vier Wochen, als der GAMMA-Immunglobulintiter die höchsten Werte erreicht hatte, wurden ohne nochmaliges Boostern aus der Ohrvene des Tieres ca. 30 - 40 ml Blut entnommen. Direkt anschließend wurde das Blut zur Gerinnung für 30 min bei 37°C inkubiert, über Nacht bei 4°C aufbewahrt und dann für 10 min bei 10000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand, das Serum, wurde bei -70°C

aufbewahrt.

6.2 Anreicherung der IgG-Antikörper

(Die Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C durchgeführt.)

Eine Protein A-Sepharose 4B/CL-Säule (0,9 cm x 15 cm, Säulenvolumen 5 ml) wurde mit drei Säulenvolumen NCP-Puffer äquilibriert. 4 - 6 ml Serum wurden mehrfach (3-4 mal) über diese Säule zirkuliert. Danach wurde die Säule mit NCP-Puffer proteinfrei gewaschen (OD 280nm = 0,02). Gebundene IgG-Antikörper wurden mit 0,1 M Glycin/HCl, pH 3,0 eluiert. Das Eluat wurde mit Tris neutralisiert und mit Ammoniumsulfat für 12 Stunden bei 4°C präzipitiert. Die gefällten Antikörper wurden abzentrifugiert, in 20 mM Natriumphosphatpuffer aufgenommen und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die Aufbewahrung der IgG-Antikörper erfolgte bei -20°C. Eine Proteinbestimmung der IgG-Fraktionen erfolgte nach Lowry (1951). Folgende Antikörperkonzentrationen konnten bestimmt werden; für anti-cap42(a) 15 mg/ml, anti-cap42(b) 23 mg/ml, anti-natives-cap42(b) 18 mg/ml, anti-Aktin 16 mg/ml, anti-Fragmin (erhalten von H. Hinssen) 0,4 mg/ml.

6.3 Radioimmunoassay

Jeweils 1 µg Antigen pro 50 µl TDAS-Puffer wurde in einzelne Vertiefungen von Costar-Platten pipettiert und einmal mit TTX-Puffer gewaschen. Anschließend wurde mit steigenden Antikörperkonzentrationen (5 - 500 µg/100 µl) für eine Stunde bei RT inkubiert; dreimal mit TTX-Puffer gewaschen und eine weitere Stunde mit ¹²⁵I-markiertem Protein A (20000 cpm/20 µl) inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit TTX-Puffer wurden die gebundenen Protein A-Moleküle der entsprechenden Reaktionsansätze im

Zählerzeit gemessen und ausgewertet.

6.4 Immunoblotting (modifiziert nach Towbin et al., 1979)

Die gelelektrophoretische Auftrennung der zu testenden Proteine erfolgt nach 4.1. Die Gele wurden in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer für zwei Stunden mit 0,8 A und 58 V auf Nitrocellulose elektrotransferiert. Anschließend wurden die Nitrocellulosefilter für eine Stunde bei RT mit 1:100 verdünnter Antikörperlösung inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen der Filter (jeweils 10 Minuten) schloß sich eine einstündige Inkubation bei RT mit 2 uCi 125 J-markiertem Protein A pro 10 ml Verdünnungspuffer an. Nach erneutem sechsmaligen Waschen der Filter für jeweils 10 Minuten wurden die Nitrocellulosefilter getrocknet und autoradiographiert (Übernachtexposition). Bei einigen Experimenten wurde eine Anfärbung der auf Nitrocellulose transferierten Proteine direkt nach dem Transfer mit 0,1%igem Amidoschwarz in 90%igem Methanol und 2%iger Essigsäure durchgeführt.

Transferpuffer:	20	mM Tris/HCl pH 7,4
	150	mM Glycin
	20	% Methanol

Waschpuffer:	10	mM Tris/HCl pH 7,4
	0,9	% Natriumchlorid
	0,05	% Tween

Verdünnungspuffer:	10	mM Tris/HCl pH 7,4
	0,9	% Natriumchlorid
	5	% BSA

6.5 Isolierung von Polysomen aus Physarum (nach Jeffery, 1982)

Drei Tage alte Mikroplasmodien (aus 100 ml Kulturen) wurden mit dem 5-fachen Volumen an HS-Puffer resuspendiert und mit einem Plümper homogenisiert. Der nach einer anschließenden

Zentrifugation erhaltene Überstand (15000 rpm für 10 Minuten) wurde mit dem gleichen Volumen HPIS-Puffer unterschichtet und für zweieinhalb Stunden bei 4°C mit 30000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das dem klaren Pellet aufliegende gelbe Pellet mit wenig ZSS-Puffer gelöst und ebenfalls verworfen, das verbleibende klare Pellet mit einigen Millilitern LMSS-Puffer resuspendiert und mit einem kleinen Plümper homogenisiert. 20 ml ZSS-Puffer mit 20%iger Sucrose wurden mit dem Homogenat des klaren Pellets überschichtet und für 2 Stunden bei 4°C mit 35000 rpm zentrifugiert. Das Pellet enthielt die Polysomen und wurde in Polysomenpuffer aufgenommen und bei -70°C aufbewahrt.

HS-Puffer:	50	mM Tris/HCl pH 7,6
	100	mM Natriumchlorid
	100	mM Magnesiumchlorid
	75	mM EDTA
	0,2	M Sucrose
	1	mM β -Mercaptoethanol

HPIS-Puffer:	50	mM Tris/HCl pH 7,6
	100	mM Natriumchlorid
	100	mM Magnesiumchlorid
	20	% Sucrose
	1	mM β -Mercaptoethanol

ZSS-Puffer:	50	mM Tris/HCl pH 7,6
	100	mM Natriumchlorid
	100	mM Magnesiumchlorid

LMSS-Puffer	50	mM Tris/HCl pH 7,6
	50	mM Natriumchlorid
	10	mM Magnesiumchlorid

Polysomenpuffer:	25	mM Tris/HCl pH 7,6
	150	mM Natriumchlorid
	5	mM Magnesiumchlorid
	0,1	% NP40
	20	u/ml Heparin
	1	ug/ul Cycloheximid

(Heparin und Cycloheximid wurden steril filtriert, der Rest autoklaviert).

Alle Puffer wurden autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

6.6 Säulenchromatographische Auftrennung von Polysomen

6.6.1 Protein A-Sepharose (nach Taylor und Tse, 1976)

10 ml Polysomenlösung (OD 280nm 0,4) wurden mit 0,2 mg IgG-Antikörpern (Proteinkonzentration siehe 6.2) für 1 Stunde bei 4°C vorinkubiert und auf eine mit Polysomenpuffer äquilibrierte Protein A-Sepharose-Säule (siehe 6.2) gegeben. Die Säule wurde mit Polysomenpuffer proteinfrei gewaschen, die mRNA spezifisch gebundener Polysomen konnte dann mit 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 20 mM EDTA und 20 u/ml Heparin eluiert werden. Die Hauptfraktionen der eluierten mRNA wurden mit 2 Volumen Ethanol und 0,05 Volumen 4 M Natriumchlorid in Gegenwart von E.coli-tRNA gefällt, abzentrifugiert und mit DEP-behandeltem Wasser resuspendiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

6.6.2 DNaseI-Agarose

6.6.2.1 Kopplung der DNaseI an das Säulenmaterial

12,5 ml Affigel 10 (in Isopropanol) wurden nacheinander je dreimal mit 30 ml Isopropanol, Wasser und schließlich mit Kopplungspuffer gewaschen. Das so vorbehandelte Gel wurde mit 25 ml Kopplungspuffer aufgenommen und mit 100 mg DNaseI (gelöst in 10ml Kopplungspuffer) für eine Stunde bei 4°C inkubiert (DNaseI-Lösung wurde tropfenweise zugegeben). Zur Absättigung freier Aminogruppen wurden 1,25 ml 1 M Ethanolaminlösung pH 8,0 zugegeben und nochmals für 1 Stunde bei 4°C inkubiert.

10xKopplungspuffer: 1 M Hepes NaOH pH 8,0
1 M Calciumchlorid x 2 H₂O

6.6.2.2 Anreicherung spezifischer Polysomen über eine DNaseI-Agarosesäule

Eine DNaseI-Agarosesäule (0,9 cm x 15 cm, Säulenvolumen 8 ml) wurde zuerst mit modifiziertem M-Polysomenpuffer äquilibriert und dann mit 10 ml Polysomenlösung (Proteinkonzentration siehe 6.6.1.1) beladen. Die Säule wurde mit M-Polysomenpuffer proteinfrei gewaschen, spezifisch gebundene Polysomen wurden mit M-Polysomenpuffer und 8,8 M Formamid eluiert. Eine Konzentrierung eluierter Polysomen erfolgte durch Fällung mit 2 Volumen Ethanol und 0,02 Volumen 10 M Lithiumchlorid. Das abzentrifugierte Pellet wurde in Wasser gelöst und bei -70°C aufbewahrt.

M-Polysomenpuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5
 0,2 mM Calciumchlorid
 5 mM Magnesiumchlorid
 0,15 M Natriumchlorid
 10 ul DEP
 20 u/ul Heparin
 1 ug/ul Cycloheximid
 0,1 mM ATP

(Heparin, Cycloheximid und ATP wurden steril filtriert, der Rest autoklaviert).

7. In vitro-Translation

Für die zellfreie Translation wurden Polysomenfraktionen oder spezifisch eluierte mRNA (siehe 6.6) verwendet. Die Translationen wurden mit einem käuflichen Translationssystem (NEN) entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur radioaktiven Markierung translatierter Proteine wurde ^{35}S -Methionin verwendet. Nach Ende der Inkubation wurden die Translationsansätze durch Zugabe von 10 Volumen 80%igem Aceton gefällt (10 Minuten bei 0°C), in Probenpuffer gelöst und gelelektrophoretisch analysiert (siehe 4.1). Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Acrylamidgele zur Intensivierung der Signale radioaktiver

Proteine fluorographiert. Dazu wurden die Gele zur Fixierung der aufgetrennten Proteine für 30 Minuten in 10%iger TCA, 10%igem Eisessig und 30%igem Methanol geschüttelt, zweimal je 15 Minuten in DMSO entwässert, für eine Stunde in 20%igem PPO, gelöst in DMSO, geschüttelt und nach ausgiebigem Wässern auf 3MM-Papier (Whatman) getrocknet und autoradiographiert (für 1 bis 2 Tage).

Probenpuffer (Endkonzentration).:

50 mM Tris/HCl pH 6,8
10 % Glycin
1 % β -Mercaptoethanol
1 % SDS und Bromphenolblau

8. Genetische Methoden

8.1 Präparation hochmolekularer genomischer Physarum-DNA

8.1.1 Isolierung von Physarum-Zellkernen (nach Mohberg und Rusch, 1971)

40 g gepackte Zellen (aus ca. 400 ml 3 Tage alter Mikroplasmodienkultur) wurden einmal mit 0,2 M Sucrose und 10 mM EDTA pH 7,2 gewaschen, in Homogenisationspuffer aufgenommen und mit einem Braun-Mixer aufgeschlossen. Nach Zentrifugation des Homogenats (5 min/500 rpm) wurde der Überstand durch Milchfilter filtriert. Das erhaltene Filtrat wurde durch ein 1 M Sucrose-Kissen zentrifugiert. Die Kerne pelletierten und standen so für die nachfolgende DNA-Isolierung zur Verfügung.

Homogenisationspuffer: 0,25 M Sucrose
10 mM Tris/HCl pH 8,0
10 mM Magnesiumchlorid
0,1 % TritonX100

8.1.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Physarum

10^6 - 10^7 Zellkerne wurden in 5 ml Kernpuffer für 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Erhöhung der Endkonzentration der Proteinase K auf 200 μ g/ml erfolgte eine weitere Inkubation für 12 Stunden

bei 37°C. Nach einer RNase H (100ug/ml) und RNase T1 (100u/ml)-Behandlung für 60 Minuten bei 37°C wurde die Lösung dreimal mit Phenol und dreimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Nach 16-stündiger Dialyse der wässrigen Phase gegen 1xTE-Puffer erfolgte zur weiteren Reinigung der DNA eine isopyknische Caesiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation (1,5 g CsCl/ml DNA-Lösung und 0,4 mg/ml Ethidiumbromid) für 48 h bei 44000 rpm und 25°C. Die unter UV-Licht sichtbare DNA-Bande wurde abgezogen und mit n-Butanol extrahiert und die wässrige Phase über Nacht gegen 1xTE-Puffer dialysiert.

Kernpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0
 100 mM EDTA
 100 ug/ml Proteinase K
 0,5 % SDS

8.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt. Unter UV-Licht wurden jeweils knapp ober- und unterhalb des gewünschten DNA-Fragments Schnitte im Agarosegel gesetzt, in die dann Stücke von DE81-Papier eingelegt wurden. Anschließend wurde die Elektrophorese bis zur vollständigen Adsorption des DNA-Fragments an das Ionenaustauschpapier fortgeführt (ca. 1 Stunde bei 100 V). Der Papierstreifen wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, durch dessen Boden zuvor mit einer Nadel gestochen worden war. Das Eppendorfgefäß übernahm somit die Funktion einer Minisäule. Durch kurze Zentrifugationsschritte wurde mehrfach mit Puffer A gewaschen und anschließend viermal mit 100 ul Puffer B eluiert. Die isolierte DNA wurde durch Zugabe von 1 ml Ethanol über Nacht ausgefällt (bei -20°C), einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1xTE aufgenommen.

Puffer A: 10 mM Tris/HCl pH 7,5
 1 mM EDTA
 0,1 M Lithiumchlorid

Puffer B: 10 mM Tris/HCl pH 7,5
 1 mM EDTA
 20 % Ethanol
 1 M Lithiumchlorid

8.3 Hybridisierung filtergebundener Nukleinsäuren

8.3.1 Transfer von DNA auf Nitrocellulose (Southern et al., 1975)

DNA-Gele wurden vor dem Transfer in folgenden Lösungen inkubiert:

30 Minuten in 0,25 M HCl
1 Stunde in 0,5 M NaOH und
 1,5 M Natriumchlorid
1 Stunde in 0,5 M Tris/HCl pH 7,5 und
 1,5 M Natriumchlorid
10 Minuten in 10 x SSC

Anschließend wurde die denaturierte DNA über Nacht in 10xSSC auf Nitrocellulosefilter transferiert. Danach wurden die Filter für zweimal 5 Minuten in 2xSSC gewaschen, luftgetrocknet und für 2 Stunden bei 80°C in einem Vakuumofen gebacken.

8.3.2 Hybridisierung und Waschen der Filter

Hybridisierungspuffer: 1 x P
 5 x SSC
 100 ug denaturierte Heringssperma-DNA/100
 0 - 50% Formamid
 1 ug/ml PolyA (für RNA)

Die gebackenen Filter wurden in Hybridisierungspuffer (10 ml pro 40 - 50 cm²) bei entsprechend gewählter Temperatur für 2 - 4 Stunden vorhybridisiert. Anschließend wurde mit 2 ml Hybridisierungspuffer pro 40 - 50 cm² und 5 x 10⁶ cpm/ml der radioaktiv markierten DNA bzw. RNA (10⁶ cpm/ug) unter denselben Bedingungen für 12 - 16 Stunden hybridisiert. Die Waschbedingungen waren wie folgt:

- 1 Stunde mit 2xSSC/0,1%igem SDS bei 58°C
- 1 Stunde mit 1xSSC/0,1%igem SDS bei 56°C und
- 1 Stunde mit 0,1xSSC/0,1%igem SDS bei 54°C.

Die gewaschenen Filter wurden getrocknet und unter Verwendung von Verstärkerfolien autoradiographiert (über Nacht bei -70°C).

8.3.3 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

8.3.3.1 Nick-Translation

Die Nick-Translation wurde modifiziert nach Rigby et al. (1977) durchgeführt.

Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 100 μ l. Freie Nukleotide wurden aus dem Reaktionsansatz nach der Inkubation durch Zentrifugation durch eine Sephadex G50-Säule (Säulenvolumen 1 ml) abgetrennt. Die spezifische Aktivität der markierten DNA lag bei 5×10^7 bis 1×10^8 cpm/ μ g Insert-DNA.

8.3.3.2 Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase

Die Transkription wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Promega) durchgeführt. Es konnte eine spezifische Aktivität von 200×10^6 cpm/ μ g Plasmid-DNA erhalten werden.

8.4 LAMBDA gt10-Klonierung

8.4.1 Präparation der Vektor-DNA

EcoRI-geschnittene LAMBDA gt10-DNA konnte käuflich erworben werden (Promega).

8.4.2 Präparation der Insert-DNA

160 μ g chromosomale Physarum-DNA wurden mit einem zweifachen Überschuß an EcoRI vollständig geschnitten. Eine Größenfraktionierung der entstandenen DNA-Fragmente wurde durch eine Gelelektrophorese (1,2%ige Agarose) erreicht.

DNA-Fragmente in einem Bereich von 4 kbp wurden dann nach der DE81-Methode (siehe 8.4) aus dem Gel eluiert.

8.4.3 Ligation und in vitro-Verpackung

Die Ligation von vorbehandelter LAMBDA gt10-DNA mit EcoRI-geschnittener und größenfraktionierter chromosomaler Physarum-DNA erfolgte mit einem Vektor/Insert-Verhältnis von 10:1 (DNA-Endkonzentration im Reaktionsansatz 220 ug/ml).

10xLigationspuffer: 0,6 M Tris/HCl pH 7,5
50 mM Magnesiumchlorid
50 mM DTT
10 mM ATP

Ligationsansatz:	<u>Physarum</u> -DNA (0,5 ug/ul)	0,86 ul
	Vektor-DNA (0,5 ug/ul)	2,70 ul
	10xLigationspuffer	1,00 ul
	T4-Ligase (1 u/ul)	1,00 ul
	H ₂ O	4,44 ul

Die Inkubationszeit betrug 16 Stunden bei 12°C.

Die für die in vitro-Verpackung der DNA benötigten Extrakte (Promega, aufbewahrt bei -70°C) wurden auf Eis halb aufgetaut, der Ligationsansatz (10 ul mit 2,2 ug ligierter DNA) dazupipettiert und für 2 Stunden bei 22°C inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml Phagenverdünnungspuffer zugesetzt und je 25 ul Chloroform, um bakterielles Wachstum zu verhindern. Die Phagenlösung wurde dann bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

8.4.4 Plattierung rekombinanter Klone

Eine Übernachtskultur des Wirtsbakteriums C600 hflA⁻ wurde abzentrifugiert und mit 10 mM Magnesiumsulfat resuspendiert. Je 100 ul dieser Bakteriensuspensionen wurden mit Aliquots der Phagenlösung (10²-10⁴ pfu) infiziert und 20 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Nach Zugabe von 3 ml auf 47°C vortemperierter Top-Agarose wurden die infizierten Bakterien auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

8.4.5 Identifizierung rekombinanter Klone

A) Übertragung der Phagen-DNA auf Nitrocellulosefilter

Aliquots der in vitro-Verpackungsansätze (für Agarplatten mit einem Durchmesser von 9 cm ca. 3000 Plaques, für Agarplatten mit einem Durchmesser von 15 cm ca. 15000 Plaques) wurden mit der Übernachtskultur infiziert, mit Top-Agarose ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Vor der Übertragung der Phagen auf Nitrocellulose wurden die Platten für mindestens eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Nitrocellulosefilter luftblasenfrei auf die Top-Agarose gelegt und für 1 Minute (für die erste Replika) bzw. 5 Minuten (für die zweite Replika) dort belassen. Mit schwach radioaktiver Tinte wurde während dieser Zeit die Position der Filter auf der entsprechenden Platte markiert. Anschließend wurden die Nitrocellulosefilter nacheinander mit folgenden Lösungen für 1 Minute denaturiert, für 5 Minuten neutralisiert und ebenfalls für 5 Minuten äquilibriert:

Denaturierungspuffer:	1,5 M Natriumchlorid
	0,5 M Natriumhydroxid
Neutralisierungspuffer:	1,5 M Natriumchlorid
	0,5 M Tris/HCl pH 8,0
Äquilibrierungspuffer:	2xSSC

Die so behandelten Nitrocellulosefilter wurden luftgetrocknet und anschließend für zwei Stunden bei 80°C in einem Vakuumofen gebacken.

B) Hybridisierung der Replikafilter

Die gebackenen Nitrocellulosefilter wurden zuerst für 5 Minuten in 6xSSC bei Raumtemperatur, dann für eine Stunde bei 42°C in folgendem Puffer gewaschen.

50	mM Tris/HCl pH 8,0
1	M Natriumchlorid
1	mM EDTA
0,1	% SDS

Anschließend wurden die gewaschenen Nitrocellulosefilter für zwei

bis vier Stunden vorhybridisiert und anschließend über Nacht hybridisiert. Für Hybridisierungspuffer und die Waschbedingungen nach erfolgter Hybridisierung siehe 8.3.2. Die getrockneten Filter wurden dann für 12 - 48 Stunden autoradiographiert.

C) Isolierung positiver Klone

Positive Plaques wurden anhand der Autoradiographie identifiziert. Mit sterilen Pasteurpipetten wurden aus der Top-Agarose Stücke ausgestanzt, welche die positiven Plaques enthielten und in 500 μ l SM/10 μ l Chloroform überführt.

8.5 Präparation von LAMBDA-DNA

8.5.1 LAMBDA-DNA-Minipräparation

Zur Amplifizierung positiver Klone wurden Phagen in der Konzentration ausplattiert, die zu einer konfluenten Lyse des Bakterienrasens führte. Die Agarplatte wurde mit 5 ml SM (siehe 2.3) überschichtet und 2 Stunden bei RT inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, um Zellen und Agarpartikel abzutrennen. Nach einer RNase H und DNaseI-Inkubation (je 1 μ g/ml für 30 Minuten bei 37°C) wurden die Phagenpartikel aus dem Überstand durch Zugabe von 1 Volumen 20%igem PEG/2 M Natriumchlorid in SM für 1 Stunde bei 0°C gefällt. Das Phagenpräzipitat wurde für 20 Minuten bei 10000 rpm und 4°C abzentrifugiert und in 0,5 ml SM resuspendiert. Die Lyse der Phagenpartikel erfolgte durch Zugabe von 0,1%igem SDS und 5 mM EDTA für 15 Minuten bei 68°C. Nach Phenol- und Chloroformextraktion wurde die DNA aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol gefällt (20 Minuten bei -70°C), einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 μ l 1xTE aufgenommen. Mit der isolierten DNA konnten drei bis vier Restriktionsanalysen durchgeführt werden.

8.5.2 LAMBDA-DNA Isolierung im großen Maßstab (LAMBDA gt11 und LAMBDA gt10)

Es wurde 1 ml Übernachtskultur der Wirtsbakterien (für LAMBDA gt11: KM392pMC9; für LAMBDA gt10: C600hflA⁻) in LB-Medium/0,2%ige Maltose mit dem Phagenlysat versetzt (Phagen/Wirt-Verhältnis für LAMBDA gt11 1:5, für LAMBDA gt10 1:200). Nach einer 20-minütigen Vorinkubation bei 37°C wurde vorgewärmtes LB-Medium (4 x 150 ml) mit diesen infizierten Kulturen inokuliert und bei 37°C geschüttelt (für LAMBDA gt11 zuerst 20 Minuten bei 42°C und dann 2 - 3 Stunden bei 37°C, für LAMBDA gt10 kein 42°C-Schritt und über Nacht Inkubation bei 37°C). Nach Chloroformzugabe (2 ml pro 150 ml Medium) und Inkubation für 5 Minuten bei 37°C wurde die lysierte Kultur mit Natriumchlorid versetzt (9 g auf 150 ml Medium für 15 Minuten bei 0°C), abzentrifugiert (20 Minuten bei 8000 rpm und 4°C) und die Phagen aus dem Überstand mit PEG6000 (10,5 g auf 150 ml Ausgangsmedium) gefällt für 1 Stunde bei 0°C. Die Phagen wurden pelletiert (20 Minuten bei 8000 rpm und 4°C), in 8 ml SM aufgenommen und mit 4 mg DNaseI bzw. RNase A, sowie 0,4 g Cäsiumchlorid pro ml Phagenlösung versetzt. Eine weitere Aufreinigung erfolgte dann über zwei Cäsiumchloridstufengradienten. Für Stufengradient 1 wurde eine Dichte der Phagenlösung mit Cäsiumchlorid auf 1,3 g/cm³, für Gradient 2 auf 1,7 g/cm³ eingestellt.

Die Reihenfolge der Schichtung sah wie folgt aus:

Gradient 1		Gradient 2	
Phagenlösung	10 ml	CsCl (1,3 g/cm ³)	7 ml
CsCl (1,5 g/cm ³)	2 ml	CsCl (1,5 g/cm ³)	2 ml
CsCl (1,7 g/cm ³)	1 ml	Phagenlösung	5 ml

Im Falle 1 sedimentierten die Phagenpartikel in Richtung Boden, im Falle 2 in Richtung Spitze des Zentrifugenröhrchens. Die Gradienten wurden im Swing-Out-Rotor SW40 für 1 Stunde bei 15°C

und 34000 rpm zentrifugiert. Die Phagenpartikel sedimentierten jeweils bei einer Dichte von 1,45 g/cm³. Die Banden waren im normalen Licht sichtbar (da optisch dichter als Cäsiumchlorid). Die abgezogene Phagenbande wurde nach der zweiten Zentrifugation über Nacht gegen 10 mM Magnesiumchlorid, 50 mM Tris/HCl pH 8,0 und 10 mM Natriumchlorid dialysiert. Die dialysierten Phagenpartikel wurden mit 50 µg/ml Proteinase K, 20 mM EDTA und 0,5%igem SDS für 1 Stunde bei 65°C inkubiert, anschließend mit Phenol und Chloroform extrahiert und über Nacht bei 4°C gegen 1xTE dialysiert.

8.6 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Es wurde entsprechend der Calciumchloridmethode nach Morrison (1979) vorgegangen. Folgende Stämme wurden präpariert. HB101 zur Transformation von Plasmid-DNA (pGem2) und JM109 zur Transformation von M13-RF-DNA.

8.7 Subklonierung mit Plasmid pGem2

8.7.1 Präparation der Plasmid-DNA

5 µg pGem2-DNA (2,9 kbp) wurden mit dem zweifachen Überschuß an EcoRI vollständig geschnitten und in einer anschließenden Enzymreaktion dephosphoryliert. Zur Entfernung der 5'-Phosphatreste wurde eine Inkubation mit der alkalischen Phosphatase durchgeführt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zur Inaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 70°C inkubiert, die DNA daran anschließend gefällt und in 1xTE-Puffer aufgenommen.

8.7.2 Ligation und Transformation des rekombinanten Plasmids

Die Ligation von behandelter Plasmid-DNA mit der Insert-DNA (EcoRI-geschnittene Physarum-c-DNA, 1,35 kbp) erfolgte bei einem Insert/Vektor-Verhältnis von 3:1 (DNA-Endkonzentration im Ligationsansatz 50 µg/ml). Für jede Transformation wurden 40 ng ligierte DNA in einem Volumen bis zu 50 µl mit je 100 µl aufgetauten transformationskompetenten HB101-Zellen zusammenpipettiert und für 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Es folgte ein Temperaturschock für zwei Minuten bei 42°C, daran anschließend wurden die Reaktionsansätze mit jeweils 50 Volumen LB-Medium verdünnt und für ca. 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

8.7.3 Plattierung und Identifizierung transformierter Bakterien

Aliquots der verdünnten Transformationsansätze (10 bis 1000 µl) wurden auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmarker (siehe 2.2.2) ausplattiert und für 12 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die auf Amp-Platten gewachsenen Kolonien konnten als Transformanten identifiziert und durch eine Miniplasmidpräparation (siehe 8.8.1) auf Vorhandensein eines Inserts überprüft werden.

8.8 Plasmid-DNA-Isolierung

8.8.1 Plasmid-DNA-Minipräparation nach der "boiling"-Methode (Holmes, 1981)

Eine große Bakterienkolonie oder der Bakterienniederschlag einer Übernachtskultur (ca. 5 ml) wurden in 350 µl STET-Puffer aufgenommen und 25 µl einer frisch angesetzten Lysozymlösung (10 mg/ml) zugegeben und gemischt. Die Bakteriensuspension wurde 40 Sekunden bei 100°C inkubiert, anschließend abzentrifugiert. Der Überstand enthielt 1 bis 2 µg Plasmid-DNA, die mit Ammoniumacetat

und Isopropanol ausgefällt und in 1xTE-Puffer aufgenommen wurde. Die Überprüfung der DNA erfolgt auf einem Agarosegel (siehe 4.3).

8.8.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung (Holmes, 1981)

Der Bakterienniederschlag einer 1 ml Übernachtskultur (LB/Amp für pGem2) wurde abhängig vom Volumen des Bakterienpellets in 35 bis 70 ml eiskaltem STET-Puffer aufgenommen und möglichst homogen resuspendiert. Frisch angesetzte LysozymbLösung wurde zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben und gemischt. Die Suspension wurde über einem Bunsenbrenner zum Kochen gebracht, dann 40 Sekunden in einem vorbereiteten kochenden Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation (30 Minuten bei 15000 rpm und 4°C) wurde der Überstand mit 1 g/ml Cäsiumchlorid und 60 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und über einen isopyknischen Cäsiumchlorid-Dichtegradienten weiter aufgereinigt (vgl. 8.1.2).

8.9 Sequenzierung nach der Didesoxy-Sanger-Methode (1979)

8.9.1 Subklonierung mit M13-RF-DNA

6 µg mp19 DNA (7,5 kbp, replikative Form) wurde mit dem 10-fachen Überschuß an EcoRI vollständig geschnitten. Nach Fällen der DNA wurde mit 6-fachem Überschuß an HindIII nachgeschnitten. Als Insert-DNA dienten ca. 3 kbp große chromosomale EcoRI-Fragmente, die ebenfalls mit HindIII nachgeschnitten wurden. Die beiden HindIII/EcoRI-Fragmente (0,9 Bp, 2,1 kbp) wurden der nachfolgenden Ligationsreaktion als Gemisch zugesetzt (Ligationsbedingungen siehe 8.7.2). Die ligierte DNA (Volumen 10 µl) wurde zusammen mit je 100 µl, bei 0°C aufgetauten, transformationskompetenten JM109 Zellen für 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Nach einem anschließenden 2-minütigen 42°C-

Temperaturschritt wurden jeweils 100 μ l exponentiell wachsender JM101-Zellen dazupipettiert (Um exponentiell wachsende Zellen zu erhalten, wurde frisches LB-Medium mit einer Übernachtskultur von JM101-Zellen angeimpft und für ca. 2 Stunden bei 37°C geschüttelt). Aliquots dieser Bakteriensuspension (20 μ l bis 180 μ l) wurden mit auf 47°C vortemperierter Top-Agarose, der IPTG und X-Gal zugesetzt worden war (siehe 2.2.2) auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Rekombinante M13-Phagen wurden als weiße Plaques (Inaktivierung der β -Galaktosidase) identifiziert, mit sterilen Pasteurpipetten aus der Top-Agarose ausgestochen und in je 100 μ l 1xTE überführt. Für eine Vermehrung der rekombinanten M13-Phagen wurden jeweils 3 ml exponentiell wachsender JM101-Zellen mit diesen isolierten Phagen (1 bis 2 μ l) infiziert. Nach einer Inkubation von viereinhalb Stunden bei 37°C unter ständigem Schütteln wurden die Zellen abzentrifugiert. Der Zelniederschlag wurde als Phagenstammlösung bei 4°C aufbewahrt. Aus dem Überstand wurde einzelsträngige rekombinante M13-DNA präpariert. Hierzu wurden die Phagen aus dem Überstand (je 1,2 ml) mit 0,25 ml 20%igem PEG, 2,5 M Natriumchlorid für 15 Minuten bei Raumtemperatur präzipitiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ entfernt und die Phagenpartikel mit 200 μ l 1xTE resuspendiert. Es folgten zwei Extraktionen mit Phenol/Chloroform (1:1) und eine weitere Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Die DNA wurde dann aus der wässrigen Phase mit Ethanol/3 M Natriumacetat-Gemisch (25:1) ausgefällt, getrocknet und in 30 μ l 1xTE gelöst. Jeweils 7 μ l dieser DNA-Lösung wurden dann für die sich daran anschließende Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

8.9.2 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierungsreaktion wurde gemäß der Didesoxymethode nach Sanger (1977) modifiziert nach Bigging et al. (1983) durchgeführt. Im Unterschied zur Originalpublikation von Sanger (1977) wurde ^{35}S -dATP an Stelle von ^{32}P -dATP verwendet. Außerdem befand sich kein Natriumchlorid im Polymerisationsansatz. Im weiteren wurde β -Mercaptoethanol statt DTT der Sequenzierungsreaktion zugesetzt, da die Reaktion bei 56°C durchgeführt wurde (nach Nader et al., 1985).

C. ERGEBNISSE

1. Biochemische Charakterisierung der Aktin-Bindungsproteine aus Physarum polycephalum

1.1 Gelelektrophorese

Das Molekulargewicht der drei Proteine Aktin, der F-Aktin-Cappingproteine cap42(a+b) und Fragmin aus Physarum polycephalum, wurde durch eine eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der gereinigten Proteine bestimmt. In Abb. 3 ist das mit Coomassie angefärbte Proteingel abgebildet. Die drei Aktin-Bindungsproteine aus Physarum (für Fragmin siehe Hinssen, 1981), wie auch Aktin selbst, besitzen ein Molekulargewicht von etwa 42 kd.

Zur weiteren Charakterisierung wurde der isoelektrische Punkt der beiden Cappingproteine cap42(a) und cap42(b) bestimmt. Dazu wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese (O'Farrell, 1975) durchgeführt. Für die erste Dimension wurde eine isoelektrische Fokussierung in einem pH-Bereich von 4 bis 7 gewählt, in der zweiten Dimension erfolgte die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht mittels einer 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Abb. 4 zeigt die aufgetrennten, mit Coomassie angefärbten Proteine. Cap42(b) verhält sich identisch zu Aktin und weist einen isoelektrischen Punkt von 5,4 auf. Die elektrische Ladung von cap42(a) unterscheidet sich sehr deutlich von den beiden anderen Proteinen. Für cap42(a) konnte ein isoelektrischer Punkt von 6,1 bestimmt werden.

42 kd Proteine aus Physarum p.

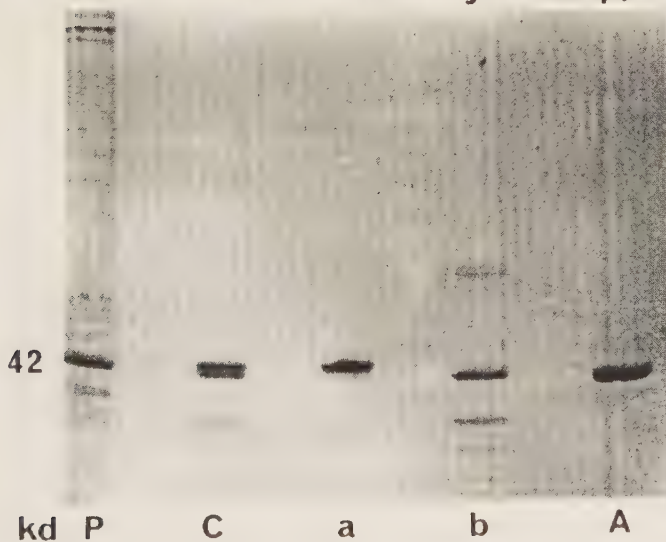


Abb. 3:

Eindimensionale Auftrennung der 42 kd-Proteine aus Physarum durch eine SDS-PAGE (12%):

P: Zellhomogenat aus Microplasmodien (10 ug)

C: isolierter Komplex cap42(a+b) (3 ug)

a: isoliertes cap42(a) (4 ug)

b: isoliertes cap42(b) (10 ug)

A: Physarum-Aktin (3,5 ug)

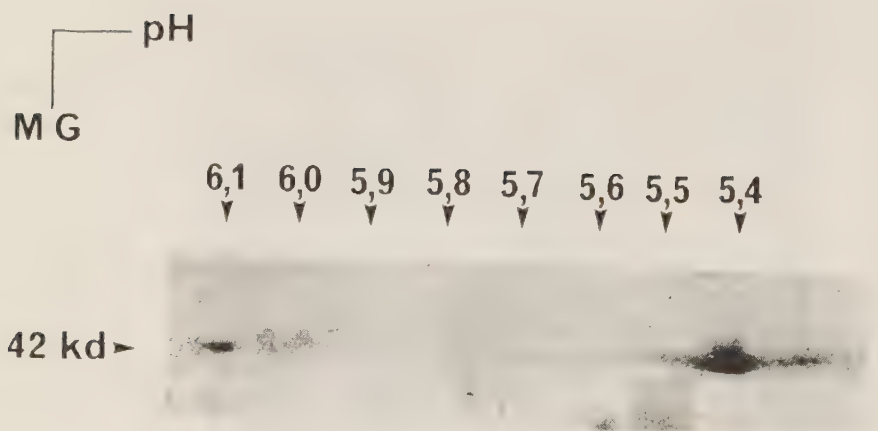


Abb. 4:

Zweidimensionale Gelelektrophorese

Physarum-Aktin (6 ug) und cap42(a+b) (4 ug)

1. Dimension: isoelektrische Fokussierung, pH 4-7

2. Dimension: 15% SDS-PAGE

1.2 Limitierte Proteasespaltungen

Aktin und die Aktin-Bindungsproteine wurden auch durch Versuche mit limitierten Proteasespaltungen miteinander verglichen. Jeweils konstante Proteinmengen an Aktin beziehungsweise Cappingprotein wurden mit steigenden Konzentrationen des Enzyms Subtilisin, einer Protease, die vorwiegend nach Glutaminsäureresten spaltet, inkubiert und die entstandenen Spaltpeptide auf 12%igen Polyacrylamidminigelen aufgetrennt. Entsprechende Experimente wurden mit dem Enzym Trypsin, das spezifisch nach den Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet, durchgeführt. Die Abb. 5A/B zeigen die Peptidmuster von cap42(a) und Aktin nach der Spaltung mit der Protease Subtilisin beziehungsweise von cap42(a) und Aktin nach Trypsinbehandlung. Man findet deutliche Unterschiede zwischen den Peptidmustern cap42(a) und Aktin, unabhängig von der eingesetzten Proteasemenge. Im Gegensatz dazu schienen die tryptischen Spaltprodukte von cap42(a) und Fragmin identisch zu sein (Maruta et al., 1984). Weitere limitierte tryptische Spaltungen von cap42(b) und Fragmin (Maruta et al., 1984), führten zu der Feststellung, daß die vier untersuchten Proteine in zwei Untergruppen eingeteilt werden können: in eine Untergruppe A, bestehend aus den Proteinen Aktin und cap42(b) und eine Untergruppe B mit den Proteinen cap42(a) und Fragmin.

2. Immunologische Charakterisierung der Aktin-Bindungsproteine aus Physarum polycephalum

2.1 Kreuzreaktivität mit heterologen anti-Aktinseren

Eine weitere Möglichkeit, die Verwandtschaft der vier Proteine näher zu untersuchen, bestand auch in der Anwendung immunologischer Methoden. Mit heterologen anti-Aktinseren sollte die Aktin-Ähnlichkeit der Aktin-Bindungsproteine aus Physarum geprüft werden. Da es sich bei Aktin um ein sehr konservatives Protein handelt, konnten eventuelle Kreuzreaktivitäten mit heterologen anti-Aktinseren vermutet werden.

Getestet wurden zwei unterschiedliche anti-Aktinseren: zum einen ein polyklonaler Antikörper gerichtet gegen das Aktin aus Dictyostelium discoideum, einem zellulären Schleimpilz (Kimmel et al., 1982); zum anderen ein polyklonaler Antikörper gegen das Aktin aus Hühnchenmuskel. Im Festphasenradioimmunoassay wurden Verdünnungen dieser genannten anti-Aktinseren auf eventuelle Kreuzreaktionen mit den Proteinen cap42(a), cap42(b), Aktin und Fragmin überprüft. Abb. 6a+b zeigen die Auswertung dieser Radioimmunoassays. Die Kreuzreaktivität der Aktin-Antikörper mit Physarum-Aktin, aber auch mit den drei Aktin-Bindungsproteinen, war unerwartet gering und somit war die Charakterisierung der vier Proteine unter Zuhilfenahme artfremder anti-Aktinseren nicht möglich.

2.2 Kreuzreaktivität mit Antiseren gegen Aktin und Aktin-Bindungsproteine aus Physarum polycephalum

2.2.1 Gewinnung polyklonaler Antikörper

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper wurden weiße Neuseeland Kaninchen (weiblich) mit folgenden Antigenen immunisiert:

- SDS-denaturiertes cap42(a) beziehungsweise cap42(b); die beiden

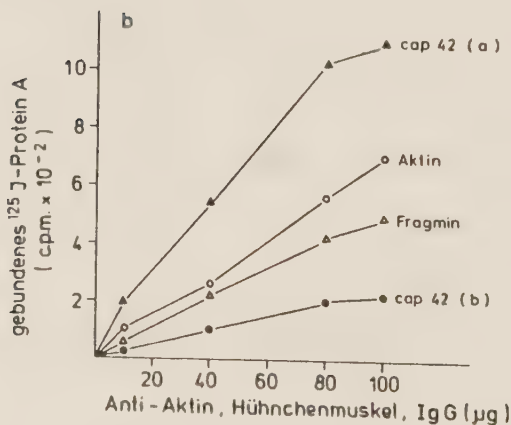
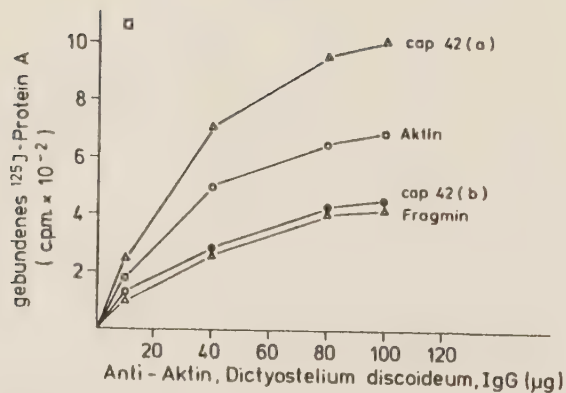


Abb. 6:

RIA der Antikörper anti-Aktin aus Dictyostelium discoideum (6a) bzw. Hühnchenmuskel (6b) mit den Proteinen cap42(a), cap42(b), Fragmin, Aktin (je 1 µg) aus Physarum (siehe B.6.3)

Proteine wurden aus SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten und das reine Protein durch Elektrophorese aus den Gelstückchen eluiert.

- Natives cap42(b) und oxydiertes Physarum-Aktin. Um die Immunogenität von Aktin zu verbessern, wurde natives G-Aktin für 2 Stunden bei 4°C mit Ameisensäure oxydiert.

Die gewonnenen Seren wurden durch eine Affinitätschromatographie an einer Protein A-Sepharose-Säule weiter aufgereinigt.

2.2.2 Charakterisierung der Antikörperspezifität in Immunoblots

In einem ersten Ansatz sollte der Frage nachgegangen werden, ob die nun verfügbaren Antikörper neben den 42 kd-Proteinen auch andere Proteine aus einem Zellhomogenat wachsender Physarum-Mikroplasmodien erkennen. Proteine aus 1,5 µl gepackter Mikroplasmodien wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose elektrogeblottet und mit den verschiedenen IgG-Präparationen inkubiert. Abb. 7 zeigt das Autoradiogramm eines solchen Immunoblots. Die Antikörper anti-cap42(b), anti-natives cap42(b), anti-cap42(a) und anti-Aktin reagieren ausschließlich mit Peptiden des Molekulargewichts 42 kd in einem gesamten mikroplasmodialen Homogenat.

In einem weiteren Experiment wurde die Kreuzreaktivität des Physarum-Antikörpers anti-cap42(a) mit Aktin und eventuell weiteren Proteinen aus Zellextrakten anderer Systeme getestet. Dazu wurden gesamte Zellhomogenate aus Dictyostelium discoideum, Rinderhirn, Saccharomyces cerevisiae und Thrombozyten hergestellt. Anschließend wurde ein Immunoblot der zuvor aufgetrennten und auf Nitrocellulose transferierten Proteine der präparierten Zellhomogenate mit dem Antikörper anti-cap42(a) durchgeführt. Die Abb. 8A/B zeigen die mit Coomassie angefärbten Peptide der einzelnen Zellextrakte und das dazugehörige

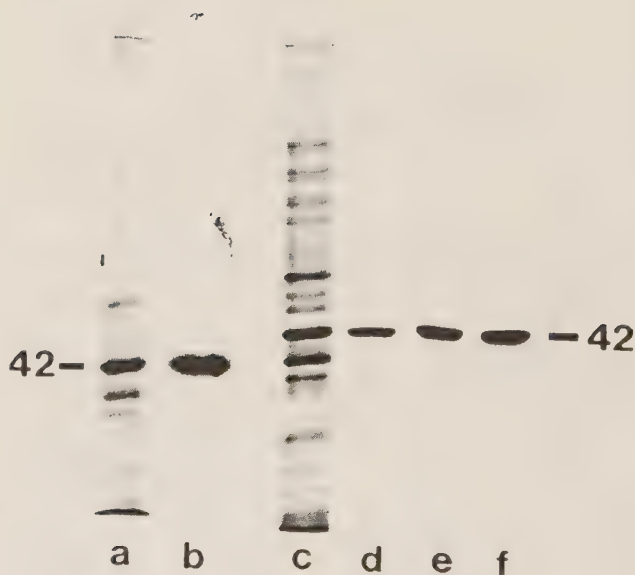


Abb. 7:

Immunoblots von Zellhomogenaten aus *Physarum*-Mikroplasma mit den Antikörpern anti-Aktin, anti-cap42(a), anti-cap42(b) und anti-natives cap42(b).
 a, c: mit Coomassie angefärbte Peptide der mikroplasmatischen Zellhomogenate (je 1,5 µl gepackte Zellen; 9% bzw. 12% Polyacrylamidgele);
 b, d, e, f: Autoradiogramme der Immunoblots. b: anti-cap42(b); d: anti-natives cap42(b), e: anti-cap42(a), f: anti-Aktin (siehe B.6.4)

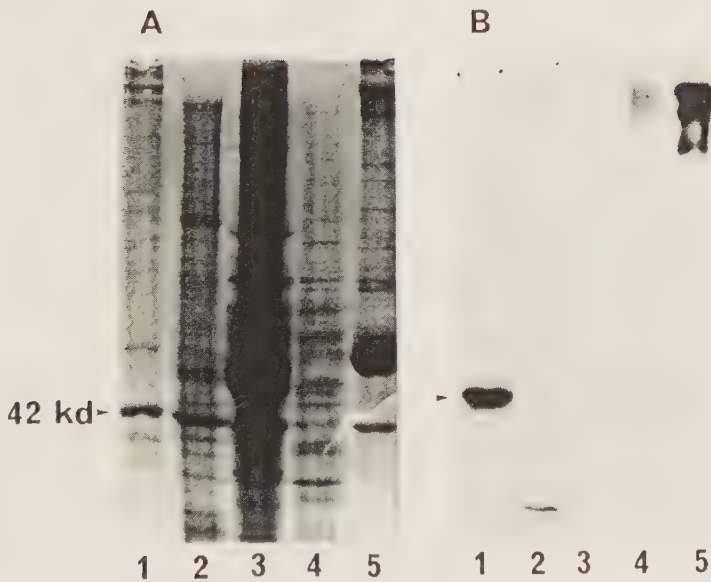


Abb. 8:
 Immunoblots verschiedener Zellextrakte mit dem Antikörper anti-cap42(a)
 (A) mit Coomassie angefärbte Peptide der Zellextrakte (je 10 µg, 12% Acrylamidgel)
 1: Physarum (Mikroplasmodien)
 2: Dictyostelium (aggregationskompetente Amöben)
 3: Rinderhirn; 4: Hefe; 5: Thrombozyten
 (B) Autoradiogramm des Immunoblots. 1 - 5 siehe (A)

Autoradiogramm. Im 42 kd-Bereich konnte keine Kreuzreaktivität mit anderen Systemen nachgewiesen werden. Allerdings zeigte der Antikörper anti-cap42(a) eine Kreuzreaktion mit hochmolekularen Peptiden (größer 200 kd) des Zellhomogenates aus Thrombozyten. Man könnte spekulieren, daß es sich hierbei um ein Spektrin-ähnliches Protein handelt. Die beiden Untereinheiten des Spektrinmoleküles mit der Zusammensetzung (ALPHA BETA)₂ besitzen ein Molekulargewicht von 240 beziehungsweise 220 kd. Spektrin, das als Zytoskelettprotein in roten Blutkörperchen nachgewiesen werden konnte, besitzt vielleicht Sequenzhomologien mit dem F-Aktin-Cappingprotein cap42(a) aus Physarum (vgl. Matsudaira et al., 1985).

2.2.3 Kreuzreaktivität der Antikörper gegen Aktin-Bindungsproteine aus Physarum in Radioimmunoassays

Schließlich sollte überprüft werden, ob eine Kreuzreaktivität der Physarum-Antikörper mit den vier 42 kd Proteinen untereinander nachgewiesen werden kann. Die Abb. 9a-e zeigen die Auswertung der Festphasenradioimmunoassays, die zur Beantwortung dieser Frage durchgeführt worden sind. Der Antikörper anti-cap42(b) erkennt nicht nur, wie eigentlich erwartet worden war, das eigene Antigen cap42(b), sondern kreuzreagiert auch mit den Proteinen cap42(a), Aktin und Fragmin (Abb. 9a).

In einem zusätzlichen Experiment sollte überprüft werden, ob dieser Antikörper anti-cap42(b) auch nach Vorinkubation mit Physarum - Aktin mit den 42 kd Proteinen aus Physarum kreuzreagiert. Dazu wurden 130 ug anti-cap42(b) mit 10 ug Physarum-Aktin für eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert. Gebildete Antigen-Antikörper-Komplexe wurden für 10 Minuten bei 100000xg und 30 PSI abzentrifugiert und der die freien Antikörper

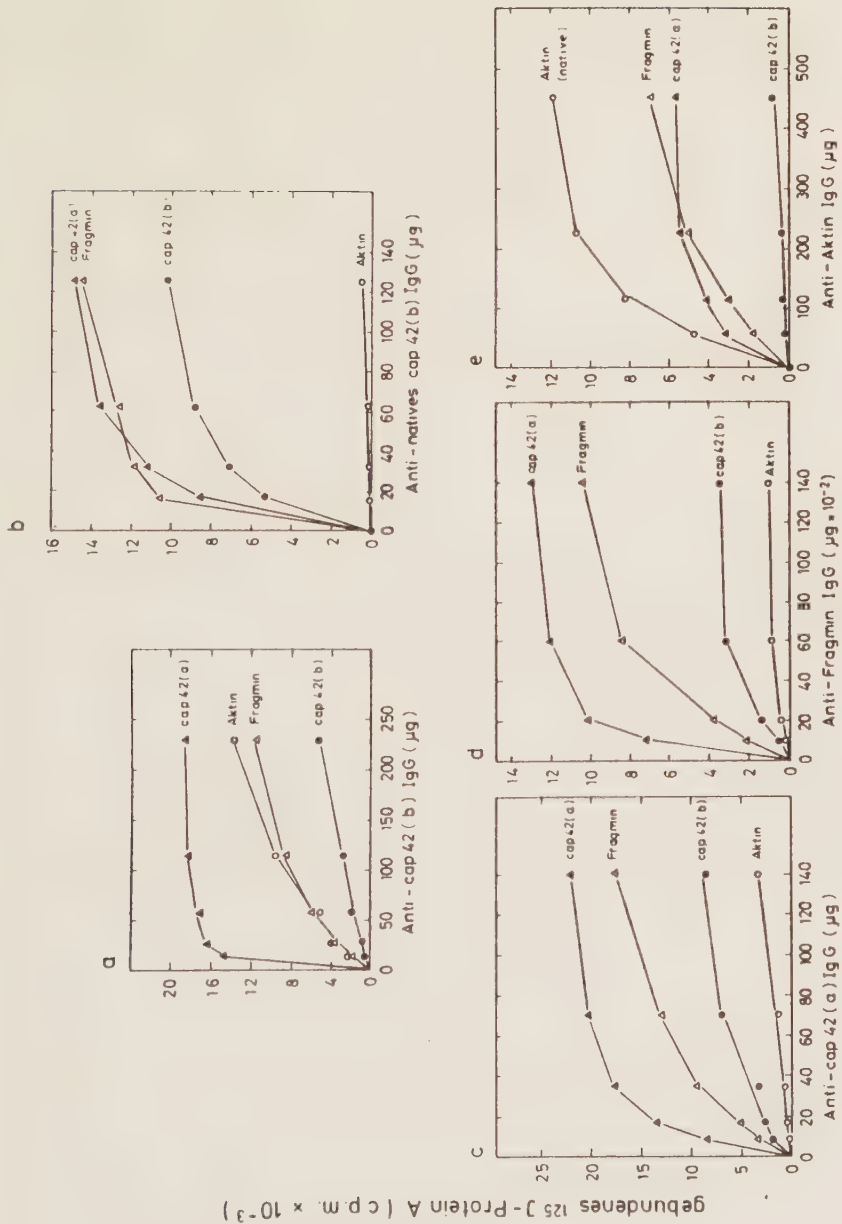


Abb. 9:
 RIA der über Protein-A-Sepharose gereinigten Antikörper anti-cap42(b) (9a) anti-natives cap42(b) (9b), anti-cap42(a) (9c), anti-Fragmin (9d), anti-Aktin (9e) mit den Proteinen cap42(a), cap42(b), Fragmin und Aktin (je 1 μg) aus Physarum

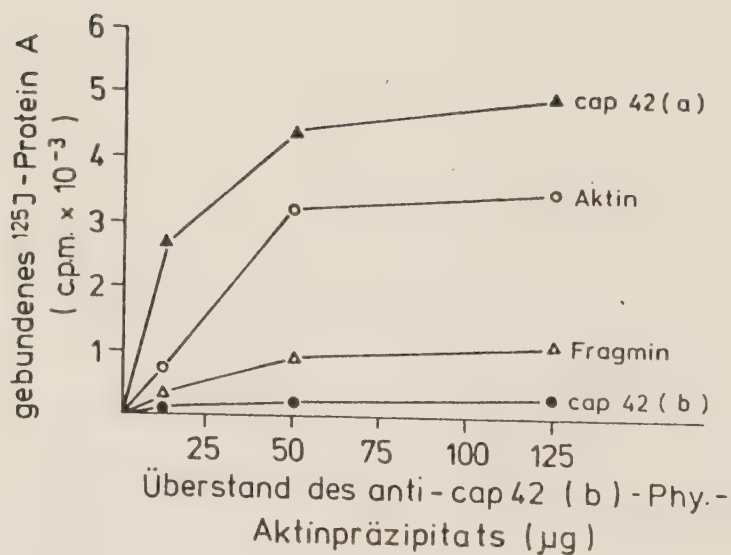


Abb. 10:
RIA des Überstandes nach einer anti-cap42(b)-Physarum-Aktinvorinkubation und anschließenden Ultrazentrifugation mit den vier 42 kd-Proteinen (je 1 ug) aus Physarum

enthaltende Überstand auf die Kreuzreaktivität mit den vier Antigenen im Radioimmunoassay getestet. Die Vorinkubation des anti-cap42(b)-Antikörpers mit Physarum-Aktin reduziert die Bindung zu allen vier Proteinen (Abb. 10), läßt aber keine Spezifitätserhöhung des Antikörpers für das Antigen cap42(b) erkennen.

In den Abb. 9b-d sind die Kreuzreaktionen der Antikörper anti-natives cap42(b), anti-cap42(a) und anti-Fragmin mit den vier Antigenen graphisch dargestellt. Alle drei aufgeführten Antikörper erkennen die F-Aktin-Cappingproteine als Antigene, nicht jedoch das Aktinmolekül. Der anti-Aktin-Antikörper (Abb. 9e) erkennt Aktin, Fragmin und cap42(a), nicht jedoch cap42(b) (Eine Kreuzreaktion des Physarum anti-Aktin-Antikörpers mit Kaninchenskelettmuskelaktin konnte nicht festgestellt werden.).

Diese immunologischen Daten deuten darauf hin, daß

- a) die Proteine Aktin, Fragmin, cap42(a) und cap42(b) gemeinsame antigene Determinanten besitzen,
- b) einige antigene Determinanten, die den drei F-Aktin-Cappingproteinen gemeinsam sind, dem Aktinmolekül fehlen und
- c) im Protein cap42(b) einige antigene Determinanten nicht vorhanden sind, die in den Proteinen Aktin, Fragmin und cap42(a) nachgewiesen werden können.

Innerhalb der Gruppe der drei F-Aktin-Cappingproteine sind sich Fragmin und cap42(a), den immunologischen Reaktionen nach zu urteilen, sehr ähnlich. Ein Antikörper, der spezifisch nur mit einem Aktin-Bindungsprotein reagiert, konnte nicht erhalten werden. Alle getesteten Antikörper erkannten neben dem eigenen Antigen mindestens zwei weitere Proteine gleichen Molekulargewichts.

2.2.4 Versuche zur Gewinnung monospezifischer polyklonaler Antikörper gegen die Aktin-Bindungsproteine aus Physarum

Ein möglicher experimenteller Ansatz, monospezifische polyklonale Antikörper zu gewinnen, war die Isolierung spezifischer Peptide, die für das jeweilige Antigen einzigartige antigene Determinanten tragen. Die im Immunoblot identifizierten Peptide könnten als spezifische Antigene für weitere Immunisierungen verwendet werden.

Zu diesem Zweck wurden in einem Pilotexperiment limitierte tryptische Spaltungen von cap42(a) und Aktin durchgeführt. Die erhaltenen Spaltpeptide wurden auf 16%igen SDS-Polyacrylamidminigelen aufgetrennt (vgl. Abb. 5A), auf Nitrocellulose gebロットet und mit den Antikörpern anti-Aktin und anti-cap42(b) hybridisiert. Die Abb. 11A und B zeigen die Autoradiogramme dieser Immunoblots. Der anti-Aktin-Antikörper (Abb. 11A) erkennt das intakte Protein cap42(a), wenn auch nur sehr schwach in Übereinstimmung mit den Radioimmunoassaydaten in Abb. 9e. Die tryptischen cap42(a)-Peptide jedoch werden nicht mehr erkannt. Die im Autoradiogramm sichtbaren Banden entsprechen dem Molekulargewicht von Trypsin und sind auf unspezifische Kreuzreaktionen des Antikörpers (sowohl anti-Aktin, Abb. 11A, als auch anti-cap42(b), Abb. 11B) mit Trypsin - bei steigenden Proteinkonzentrationen der Protease - zurückzuführen. Das intakte Aktinmolekül und verschiedene tryptische Peptide dieses Proteins ergeben dagegen ein sehr deutliches Signal im Westernblot, wenn man mit dem Antikörper anti-Aktin hybridisiert. Ein Vergleich dieser Daten mit Abb. 11B, hier wurde mit dem Antikörper anti-cap42(b) hybridisiert, macht deutlich, daß auch anti-cap42(b) nur das intakte cap42(a) (siehe Abb. 9a), nicht aber dessen tryptische Spaltpeptide erkennt. Eine Hybridisierung des

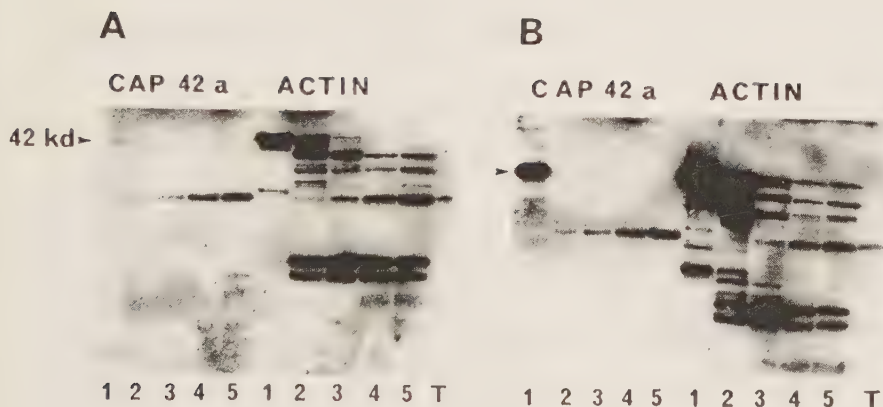


Abb. 11:
 Immunoblot tryptischer Peptide der Proteine cap42(a) und Aktin
 mit den Antikörpern anti-Aktin (11A) und anti-cap42(b) (11B)
 1 - 5: steigende Trypsinkonz. (vgl. Abb. 5A); T: 5µg Trypsin

Antikörpers anti-cap42(b) mit den tryptischen Spaltpeptiden dieses Proteins ergibt jedoch deutliche Signale im Immunoblot. Aktin und tryptische Aktinpeptide werden von beiden Antikörpern erkannt. Tryptische Aktinspaltprodukte mit für Aktin spezifischen antigenen Determinanten konnten durch eine limitierte tryptische Spaltung des Aktinmoleküls nicht erhalten werden.

Die bisher gezeigten Ergebnisse weisen auf eine Strukturhomologie dieser vier funktionell so verschiedenen Proteine hin. Erste Aminosäuresequenzanalysen des Proteins cap42(b) (Vandekerckhove, Belgien, persönliche Mitteilung), zeigen eine über 90%ige Homologie auf Aminosäureebene zwischen dem Aktin-Bindungsprotein cap42(b) und Aktin. Aufgrund von Segregationsuntersuchungen konnte gezeigt werden, daß das Physarum-Genom mindestens vier nicht verknüpfte Genloci für Aktin besitzt (Schedl und Dove, 1982). Die Ähnlichkeit zwischen cap42(b) und Aktin warf die Frage auf, ob möglicherweise eines dieser vier Aktingene für ein Aktin-ähnliches Protein kodiert, oder ob zusätzliche Aktin-ähnliche Sequenzen in der genomischen Physarum-DNA gefunden werden können. Um dieser Frage nachzugehen, mußten die entsprechenden Experimente von der Protein- auf die DNA-Ebene verlagert werden.

3. Isolierung einer Aktin-c-DNA aus Physarum

Mit Aktinsequenzen aus anderen Organismen (Seeigel-, Hefe- und Drosophila-Aktin) konnten bereits zahlreiche Experimente zur Charakterisierung der Aktingene aus Physarum durchgeführt werden. So wurden durch Mendelanalysen mit dem Drosophila- und Hefe-Aktingen mindestens vier nicht verknüpfte Aktingenorte der genomischen Physarum-DNA nachgewiesen (Schedl und Dove, 1982). Die Replikationsabfolge dieser vier Aktingene konnte durch Southernblotanalysen mit der Seeigel-Aktin-DNA bestimmt werden

(Pierron et al., 1982). Für die Auffindung Aktin-ähnlicher Sequenzen in der genomischen Physarum-DNA ist jedoch eine Physarum-spezifische Aktin-Sequenz notwendig, da die zur Identifizierung vorauszusetzende Homologie zwischen dem Physarum-Aktin-ähnlichen Gen und einem heterologen Aktinigen 'nicht zu erwarten war.

3.1 Versuch der Anreicherung spezifischer Aktin-mRNA-Moleküle durch Immunopräzipitation

Zur Isolierung einer Physarum-spezifischen Aktinsequenz wurde der folgende experimentelle Ansatz gewählt:

Durch Immunopräzipitationen von Polysomen mit den polyklonalen Physarum-Antikörpern sollten mRNA-Moleküle angereichert werden, die als umgeschriebene c-DNA Physarum-spezifische-Aktin-DNA-Sonden darstellen.

3.1.1 Präparation von Polysomen

Polysomen wurden aus wachsenden Physarum-Mikroplasmodien isoliert. Die Mikroplasmodienkultur wurde in einem Sucrose-, EDTA- und Natrium- beziehungsweise Magnesiumchlorid-haltigen Puffer homogenisiert. Es erwies sich als sehr wichtig, Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase aufzuarbeiten, da die Zahl der degradierten Polysomen in Zellen aus der stationären Phase beträchtlich höher war. Außerdem wurden bei der Polysomenpräparation wiederholte Wasch- beziehungsweise Zentrifugationsschritte vermieden, da dies auch zum Abbau von Polysomen führte. Der Homogenisationspuffer enthielt 0,2 M Sucrose, um ein isotonisches Milieu aufrechtzuerhalten, 75 mM EDTA, um ionenabhängige RNasen zu inaktivieren, Magnesiumionen (100 mM $MgCl_2$) schließlich sollten RNA/RNA-Interaktionen fördern

und damit auch einen Teil der RNase-Aktivitäten hemmen. Nach erfolgter Homogenisation konnten mit einer ersten präparativen Zentrifugation Kerne, Mitochondrien und andere Zellorganelle abgetrennt werden. Nach zwei anschließenden Ultrazentrifugationen befanden sich lösliche Proteine und freie Ribosomen im Überstand. Der Niederschlag enthielt reine Polysomen, die in einem speziellen Polysomenpuffer bei -70°C für einige Wochen aufbewahrt werden konnten.

3.1.2 Immunopräzipitationsexperimente

Die Anreicherung bestimmter mRNA Moleküle mittels einer Immunopräzipitation ist aufgrund folgender Komplexbildung möglich: Polysomen sind in Translation befindliche Ribosomen, die neben der umzuschreibenden mRNA auch schon translatierte, naszierende Aminosäureketten enthalten. Sofern diese translatierten Peptide Antigen-Information tragen, werden sie von den entsprechenden Antikörpern erkannt und es bildet sich ein Antikörper-Antigen-Polysomenkomplex. Wie im Radioimmunoassay oder Immunoblot nützt man die Eigenschaft von Protein A, dem Hüllprotein von Staphylococcus aureus aus, welches Gamma-Immunoglobuline spezifisch bindet. Eine Protein A-Sepharose-Säule wird mit dem Antikörper-Antigen-Polysomenkomplex beladen und komplexierte Polysomen binden über die Protein A-IgG-Wechselwirkung an diese Affinitätssäule. Freie Polysomen passieren diese Säule ungebunden. Die mRNA gebundener Polysomen kann mit 20 mM EDTA von der Protein A -Säule eluiert werden.

5 mg gereinigte Polysomen wurden mit 0,2 mg anti-cap42(b)-Antikörpern für eine Stunde bei 4°C inkubiert und auf eine äquilibrierte Protein A-Sepharose-Säule gegeben. Die mRNA gebundener Polysomen wurde eluiert, in vitro in einem

Retikulozytensystem (REN) translatiert und die mit 35 S-Methionin markierten translatierten Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 12a zeigt die Fluorographie dieser in vitro translatierten Proteine.

Im Immunopräzipitationsexperiment konnte unter Verwendung des Antikörpers anti-cap42(b) keine mRNA angereichert werden, die für Proteine im 42 kD Bereich kodiert. Insgesamt war die Spezifität der Antikörper nicht ausreichend, um über den experimentellen Weg der Polysomen-Immunopräzipitation spezifische DNA-Sonden zu erhalten.

Die hohe Strukturhomologie zwischen Physarum-Aktin und cap 42(b) zeigt sich auch in ihrer gemeinsamen Eigenschaft, einen 1:1-Komplex mit dem DNaseI-Molekül auszubilden (Maruta et al., 1984). Diese Eigenschaft wurde in einem zusätzlichen Polysomenexperiment ausgenutzt. Ohne vorherige Inkubation mit Antikörpern wurde eine DNaseI-Agarose-Säule mit einer Polysomenfraktion beladen, spezifisch gebundene Polysomen - mit naszierenden Aktin- oder cap42(b)-Aminosäureketten - wurden mit 8,8 M Formamid von der Säule eluiert, in vitro translatiert und die Translationsprodukte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 12b zeigt die entsprechende Fluorographie. Die Bindung der Polysomen an diese DNaseI-Agarose-Säule war sehr spezifisch. Die in vitro translatierten Proteine eluierter Polysomen zeigten alle ein Molekulargewicht von 42 kD. Jedoch war die Menge an translatiertem 42 kD Protein zu gering, sodaß auch unter Verwendung einer DNaseI-Agarose-Säule keine Anreicherung Physarum-spezifischer Aktin-mRNA erreicht werden konnte.

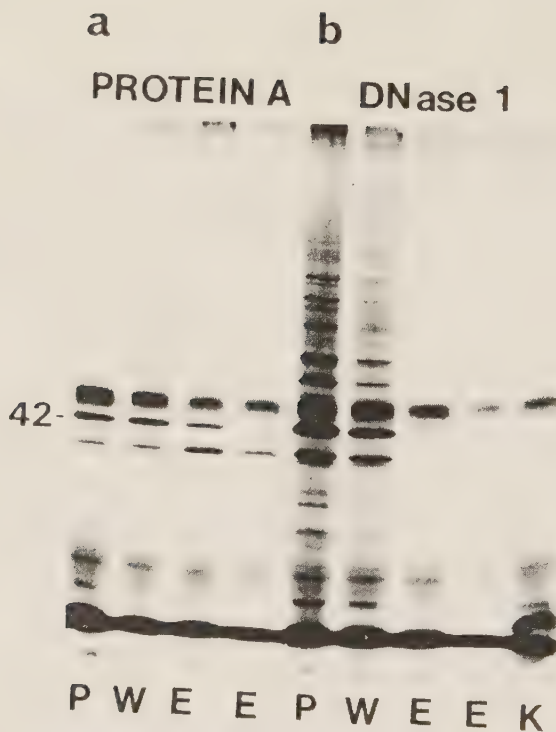


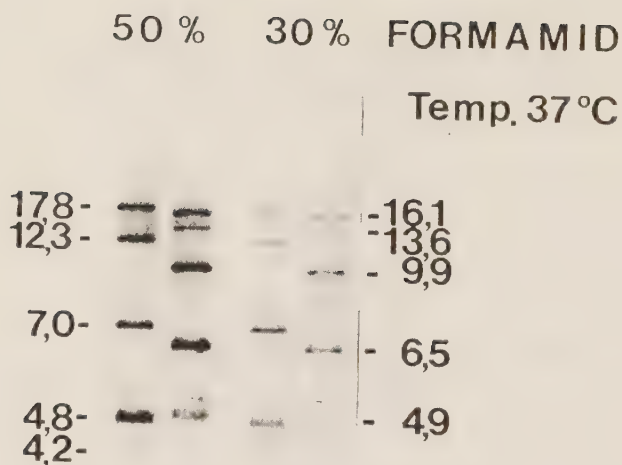
Abb. 11:
 Autoradiogramm der in vitro-Translationsprodukte spezifisch
 eluierter Polysomen
 (a): Immunopräzipitation der Polysomen mit dem Antikörper anti-
 Cap42(b), anschließende Auftrennung an einer Protein A-
 Sepharosesäule (siehe B.6.6)
 P: Polysomen vor Immunopräzipitation;
 W, E: Wasch- bzw. Eluatfraktion der Protein-A-Sepharosesäule
 (b): Auftrennung von Polysomen über eine DNase-1-Agarosesäule
 (siehe B.6.6.2)
 P: Polysomen vor der Auftrennung;
 W, E: Wasch- bzw. Eluatfraktion der DNase-1-Agarosesäule;
 Z: Kontrolle, Translationsprodukte der in Retikulozytenlysat
 enthaltenen endogenen m-RNA.

3.2 Screening einer LAMBDA gt11-Physarum-c-DNA-Genbank

Eine weitere Möglichkeit, eine Physarum-spezifische Aktinsequenz zu bekommen, stellte das Screening einer Physarum-c-DNA-Genbank mit Hilfe einer heterologen Aktin-Probe dar. Der Erhalt einer LAMBDA gt11-Physarum-c-DNA-Genbank und einer Seeigel-Aktin-DNA (siehe B.1.5) machte die Durchführung dieser Strategie möglich.

3.2.1 Hybridisierungsbedingungen für die heterologe Seeigel-Aktin-Sonde

Bevor mit dem Screening der Physarum-c-DNA-Genbank begonnen werden konnte, mußten die Hybridisierungsbedingungen für die heterologe Seeigel-Aktin-Probe durch Southernblotanalysen herausgefunden werden. Dazu wurden HindIII- und EcoRI-Spaltprodukte genomischer Physarum-DNA (vgl. 4.1.2) auf 0,8%igen Agarosegelen aufgetrennt (vgl. Abb. 24), auf Nitrocellulose transferiert und mit nick-translatierter Seeigel-Aktin-DNA hybridisiert. Durch Variation der Formamidkonzentration (bei konstanter Temperatur: 37°C) im Hybridisationspuffer wurden hohe und niedrige Stringenzbedingungen ausgetestet. Abb. 13 zeigt die Autoradiographie dieser Southernblotanalyse. Es konnte das von Schedl und Dove 1982 publizierte Bandenmuster bestätigt werden. Die fünf Signale jeder Spaltung im Autoradiogramm werden vier nicht verbundenen Aktin-Loci zugeordnet. Da dieses Bandenmuster unter beiden Hybridisierungsbedingungen erhalten wurde, ist bei allen folgenden Versuchen mit der heterologen Seeigel-Aktin-DNA mit hoher Stringenz gearbeitet worden: 50% Formamid/37°C gleichbedeutend mit 0% Formamid/68°C (hohe Stringenz während der Hybridisierung gewährleistet eine Minimierung des Hintergrundsignals).



kb H E H E kb

Abb. 13:
 Autoradiographie einer Southernblotanalyse mit nick-
 translatisierter Seeigelaktin-DNA (5×10^6 cpm/NC-Streifen).
 Hybridisierungsbedingungen:
 Hybridisierungstemperatur: 37°C
 Hybridisierungspuffer: hohe Stringenz 50% FA; niedrige Stringenz 10% FA.

H: HindIII gespaltene, genomische Physarum-DNA
 E: EcoRI gespaltene, genomische Physarum-DNA

3.2.2 Das LAMBDA gt11-Vektorsystem

Im Insertionsvektor LAMBDA gt11 (Young und Davis, 1983a/b) kann Fremd-DNA bis zu 7 kbp in die einzige EcoRI-Erkennungsstelle der LAMBDA gt11-Phagen-DNA kloniert werden. Diese EcoRI-Schnittstelle liegt im lacZ-Gen der Phagen-DNA, 53 bp vor dem β -Galactosidase-Translationsterminationskodon. Eine Selektion auf rekombinante LAMBDA gt11-Phagen kann über die Inaktivierung der β -Galaktosidase erfolgen. Wird dem Medium X-Gal, ein chromogenes Substrat der β -Galaktosidase, zugegeben, bilden ausplattierte Wildtyp-Phagen blaue Plaques (Enzym aktiv), rekombinante Phagen dagegen weiße Plaques (Enzym inaktiv, da Insertion von Fremd-DNA). Zusätzlich besitzt der LAMBDA gt11-Vektor eine Mutation im cI-Repressorgen, die zu einer Temperatursensitivität des Repressorproteins führt (inaktiv bei 42°C). Die erhaltene Physarum-c-DNA-LAMBDA gt11-Genbank besaß einen Phagentiter von 8×10^{10} pfu/ml. Die Klonierungseffizienz lag bei 5%.

3.2.3 Plaquehybridisierung und Aufreinigung eines spezifischen c-DNA-Aktin-Klons

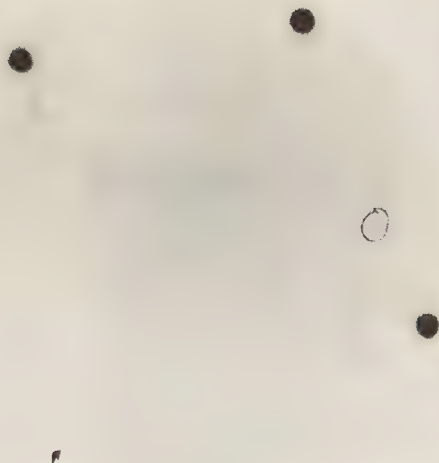
Für das Screening dieser Genbanken auf aktinspezifische Klone wurden 150000 Plaques pro Genbank mit $1,5 \times 10^4$ Phagen pro Platte (Durchmesser 15 cm) analysiert. Zur Identifizierung Aktinspezifischer Klone wurden die Plaques auf Nitrocellulose transferiert und mit nick-translatierter Seeigel-Aktin-DNA hybridisiert. Plaques, die bei dieser Plaquehybridisierung positive Signale im Autoradiogramm ergaben, wurden isoliert und zur Vereinzelung der Rekombinanten erneut ausplattiert und hybridisiert. Nach der zweiten Hybridisierung ergaben etwa 10 - 20% der aus dem primären Isolat erhaltenen Plaques positive Signale. Diese Prozedur des sogenannten Rescreenens wurde solange

wiederholt, bis alle Plaques eines Isolates positive Hybridisierungssignale im Autoradiogramm zeigten. Insgesamt waren drei Hybridisierungszyklen erforderlich. Abb. 14a+b zeigen die Plaquehybridisierung und Aufreinigung eines positiven LAMBDA gt11-Klon, LAMBDA8/2.

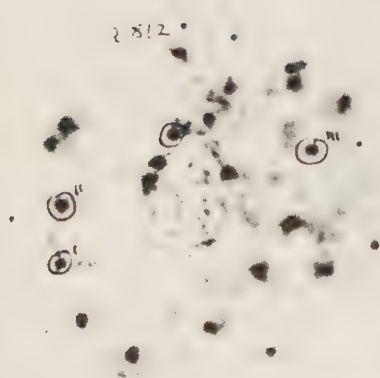
3.3 LAMBDA-DNA-Präparation des spezifischen Aktin-Klons

Von entscheidender Bedeutung bei einer im großen Maßstab durchgeführten LAMBDA-DNA-Präparation (1 l Medium) ist das Phagen/Wirt-Verhältnis, mit dem das Medium angeimpft werden soll. Das von Maniatis (1982) angegebene 1:200 Verhältnis konnte für den LAMBDA gt11-Klon und den entsprechenden Wirt KM392PMC9 nicht übernommen werden. Um eine optimale Phagenausbeute zu bekommen, mußte mit einem Phagen/Wirt-Verhältnis von 1:5 gearbeitet werden. Zur kompletten Lyse der Zellen wurde den Kulturen kurz vor Aberntung der Phagen etwas Chloroform zugegeben. Die freigesetzten Phagen wurden mit PEG 6000 präzipitiert und über zwei Cäsiumchlorid-Stufengradientenzentrifugationen weiter aufgereinigt. Für die erste Zentrifugation wurde der Gradient mit der Phagensuspension überschichtet, im zweiten Ultrazentrifugationslauf erfolgte eine Unterschichtung des Stufengradienten mit der Phagenlösung. Die Phagenpartikel sedimentierten jeweils bei einer Dichte von $1,45 \text{ g/cm}^3$. Zur LAMBDA-DNA-Isolierung wurden die Phagenpartikel enzymatisch mit Proteinase K aufgebrochen. Aus 1 l -Kulturen konnten im Durchschnitt 300 μg reine LAMBDA-DNA isoliert werden. Die isolierte LAMBDA8/2-DNA wurde mit EcoRI gespalten und die entstandenen DNA-Fragmente gelelektrophoretisch auf einem 0,8%igen Agarosegel überprüft. Abb. 15 zeigt das mit Ethidiumbromid angefärbte Gel. Die Banden im hochmolekularen

a



b

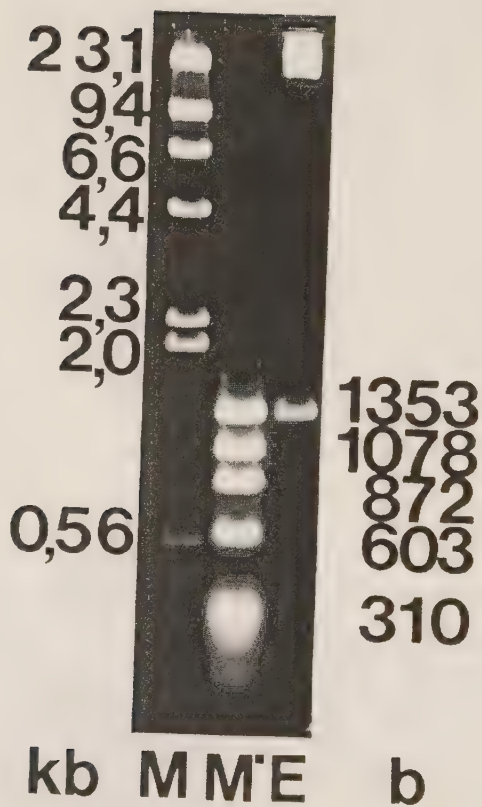


1. rescreen



2. rescreen

Abb. 14:
Screening der LAMBDA gt11-Genbank/Seeigel-Aktin
(a) Plaquehybridisierung
(b) Plaqueaufreinigung positiver Klone


$$\begin{array}{c} \text{A} \\ \vdots \\ \text{B} \end{array} \quad \begin{array}{c} \text{C} \\ \vdots \\ \text{D} \end{array}$$

Bereich EcoRI-geschnittener LAMBDA-DNA entsprechen der DNA der beiden Phagenarme, das klonierte c-DNA-Fragment zeigt ein Molekulargewicht von 1,35 kBp. Da die kodierende Region des Physarum-Aktinogens ca. 1,1 kBp umfaßt, ließ ein Molekulargewicht von 1,35 kBp auf eine vollständige, reverse Transkription der Aktin-mRNA in komplementäre c-DNA schließen. Eine spätere Teilsequenzierung dieses c-DNA-Fragmentes sollte darüber Aufschluß geben.

3.4 Subklonierung der Aktin-c-DNA aus Physarum

Zunächst mußte dieses c-DNA-Fragment subkloniert werden, um in ausreichender Menge als homologe Physarum-Aktinprobe zur Verfügung zu stehen.

3.4.1 Das Klonierungssystem pGem2

Als Klonierungssystem wurde das Plasmid pGem2 gewählt. pGem2 (2,9 kBp) stellt eine Weiterentwicklung des Plasmids pBR322 dar. Folgende Vorteile bestehen gegenüber dem Ausgangsplasmid:

- pGem2 ist ein "high copy number" Plasmid, infolgedessen entfällt eine Chloramphenicol-Amplifikation.
- pGem2 besitzt eine Polylinkerregion, die Flexibilität in der Auswahl der Restriktionsenzyme zuläßt. Wichtig für die Entscheidung zugunsten pGem2 war die Existenz einer EcoRI-Stelle innerhalb der Polylinkerregion, da die c-DNA als EcoRI-Fragment vorlag.
- pGem2 besitzt in 5'- beziehungsweise 3'-Nachbarschaft zur Polylinkerregion zwei Promotoren für die SP6 beziehungsweise T7 RNA-Polymerase. Nach erfolgter Klonierung des gewünschten DNA-Fragments ist in diesem System keine präparative Isolierung des Inserts und dessen anschließende Nick-Translation notwendig. Das

rekombinante Plasmid wird lediglich 3' zur Klonierungsstelle linearisiert. Danach kann mit einer der beiden RNA-Polymerasen und einem radioaktiv markierten NTP ein Transkript der klonierten DNA hergestellt werden, dessen spezifische Aktivität 50- bis 100-fach höher ist als die nach einer vergleichbaren Nick-Translation. Das bei anschließenden Hybridisierungen entstehende DNA/RNA-Hybrid ist stabiler als der entsprechende DNA/DNA-Komplex, eine Tatsache, die stringenter Waschbedingungen während eines Hybridisierungsexperiments zuläßt und zu einer Reduktion unspezifischer Bindungen beiträgt. Der Vektor pGem2 wurde mit EcoRI geschnitten und anschließend dephosphoryliert, um eine Religation der Vektor-DNA zu verhindern.

3.4.2 Ligation von Plasmid- und Insert-DNA und Transfektion kompetenter Zellen mit dem rekombinanten Plasmid

Die wie beschrieben behandelte Plasmid-DNA wurde mit dem eluierten EcoRI-c-DNA-Fragment in einem Insert/Vektor-Verhältnis von 3:1 ligiert. Die DNA-Konzentration des Ligationsansatzes betrug 50 ug/ml. Ligierte DNA wurde mit transformationskompetenten JM109-Zellen für 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Nach einem 2-minütigen 42°C-Schritt und einer Zugabe von einem 50-fachen Volumen an Medium, um die vorhandene Calciumchloridkonzentration drastisch zu reduzieren, wurden die Zellen auf LB-amp-Platten ausplattiert. Die Transformationseffizienz betrug 3×10^4 transformierte Kolonien/ug eingesetzter Insert-DNA.

3.4.3 Plasmidpräparation transformierter Kolonien

Von drei transformierten Kolonien wurden Miniplasmidpräparationen angefertigt. Eine EcoRI-Spaltung der isolierten Plasmide zeigte

Plasmidpräparation



EcoR1



Abb. 16:

Gelelektrophoretische Analyse (0,8% Agarose) rekombinierter Plasmide (pGem2/ LAMDA 8/2-Invert); Plasmidpräparation:

1, 2, 3: Plasmide aus 3 transformierten JN109-Kolonien (je 1 µg)

EcoR1:

M: LAMDA /HindIII

1, 2, 3: EcoR1-geschnittene Plasmid-DNA der Kolonien 1 - 3

die erfolgreiche Subklonierung des c-DNA-Fragments. Abb. 16 zeigt die Gelelektrophorese der isolierten Plasmide und deren EcoRI-Fragmente. Neben der Vektor-DNA mit 2,9 kBp und der klonierten c-DNA von 1,35 kBp sind auch niedermolekulare Nukleinsäuren angefärbt, die der RNA zugeordnet werden können. Eine Spaltung des rekombinanten Plasmid mit dem Enzym HindIII, dessen Erkennungssequenz innerhalb der Polylinkerregion des Plasmids pGem2 liegt, ergab nach gelelektrophoretischer Analyse nicht die erwartete 4,25 kBp große Bande des linearisierten Plasmids, sondern zwei Banden von circa 1,35 kBp und 2,9 kBp Größe (Abb. 17a). Abb. 18 illustriert graphisch den Bereich der Polylinkerregion der pGem2-DNA nach EcoRI-Klonierung der c-DNA. Nachdem das rekombinante Plasmid mit HindIII in zwei DNA-Fragmente gespalten wurde, mußte sich eine zusätzliche HindIII-Erkennungssequenz im c-DNA-Fragment befinden. Die Zahlen 1 bis 3 in Abb. 18 stehen für drei mögliche Positionen dieser HindIII-Schnittstelle innerhalb der klonierten DNA. Jedoch nur die dritte mögliche Position erklärt die Spaltung in zwei Fragmente mit einem Molekulargewicht von ca. 2,9 kBp und 1,35 kBp (Abb. 17a). Firtel et al. (1982) konnten eine konservierte HindIII-Erkennungssequenz im 7. und 8. Codon aller bisher sequenzierten Dictyostelium-Aktogene nachweisen. So konnte auch in der DNA-Sequenz des Physarum-Aktins eine HindIII-Erkennungssequenz am Anfang des kodierenden Bereichs erwartet werden. Die Existenz dieser HindIII-Erkennungsstelle bestätigte die schon geäußerte Vermutung, ein den gesamten kodierenden Bereich umfassendes Physarum-Aktin-c-DNA-Fragment isoliert zu haben. Auch die Frage der Orientierung des klonierten c-DNA-Inserts im pGem2 wird durch die Graphik in Abb. 18 beantwortet. Die c-DNA war genähtlich



Abb. 17:
 Gelelektrophoretische Analyse (0,8% Agarose) geschnittener
 rekombinanter Plasmid-DNA der transformierten Kolonie 2 (Abb. 16)
 mit Enzymen der pGem2-Polylinkerregion
 (a) H: HindIII-gespaltene Plasmid-DNA
 M: LAMBDA /HindIII
 (b) B: BamHI-gespaltene Plasmid-DNA
 P: PstI-gespaltene Plasmid-DNA
 M: LAMBDA /HindIII

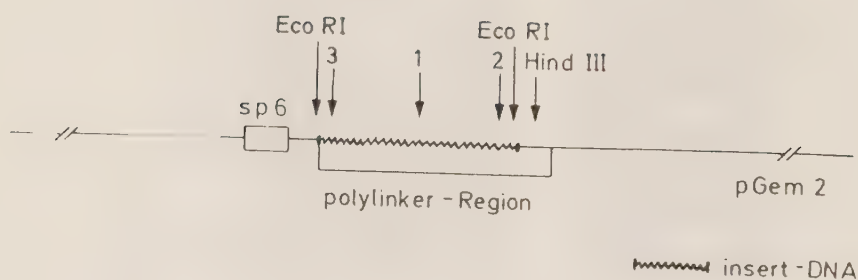


Abb. 18:
Graphische Darstellung der pGem2-Plasmid-DNA im Bereich der Polylinkerregion nach EcoRI-Klonierung der LAMBDA 8/2-Insert-DNA

hinter den SP6-Promoter kloniert worden. Eine Linearisierung des Plasmids war sowohl mit dem Enzym BamHI als auch mit PstI möglich (Abb. 17b).

3.5 Sequenzierung der klonierten c-DNA nach der Didesoxy-Sanger-Methode (1979)

Vor der Durchführung weiterer Experimente mit dieser klonierten Physarum-Aktin-c-DNA sollte mit einer Sequenzierung nach der M13-Didesoxy-Methode der endgültige Nachweis erbracht werden, daß es sich bei diesem Fragment um eine Physarum-Aktin-c-DNA handelte.

3.5.1 Das M13-Phagen-Vektorsystem

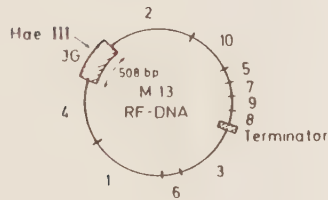
M13, ein filamentöser E. coli Phage, enthält ein einzelsträngiges, zirkuläres DNA-Genom von 6400 Basen, das für insgesamt zehn Gene kodiert. M13-Phagen wachsen nur auf sogenannten F'-E. coli Zellen. F' steht für das F-Episom, ein konjugatives Plasmid, das für besondere Strukturen auf der Oberfläche von bakteriellen Zellen, für die sog. Sexpili, kodiert. Die M13-Phagen können nur über diese Sexpili an bakterielle Zellen adsorbieren und so den Infektionsprozeß einleiten. Nach der Adsorption wird die einzelsträngige Phagen-DNA, der (+)-Strang, zunächst in eine doppelsträngige, replikative Form (M13-RF-DNA) überführt. Diese RF-DNA kann aus infizierten Zellen wie ein Plasmid isoliert und zur Klonierung verwendet werden. In einem späteren Stadium der Infektion wird der durch "rolling-circle" gebildete (+)-Strang von einem phagenkodierten ss-DNA-spezifischen Protein gebunden. Diese Bindung blockiert die weitere Synthese des komplementären (-)-Strangs. Nach Anlagerung der Phagenhüllproteine werden die Viruspartikel freigesetzt. Im Gegensatz zu den lytischen

Infektionsabläufen anderer Phagen wird hierbei die Wirtszelle nicht getötet, sondern nur ihr Wachstum um etwa den Faktor drei verlangsamt. M13-Plaques sind also nicht Zonen einer virusinduzierten Lyse, sondern Regionen langsameren Bakterienwachstums, die dadurch klarer als ihre Umgebung erscheinen. Der M13-Phage ist für die Herstellung rekombinanter DNA in einzelsträngiger Form in einem Größenbereich von bis zu 2 kBp geeignet. Längere DNA-Fragmente führen zu einer deutlichen Verlangsamung des Wachstums der infizierten Zellen. Das M13mp19-Vektorsystem besitzt (Abb.19) einen lac-Operonbereich mit dem C-Terminus des lac-Repressorgens, der gesamten regulatorischen lac-Region (Operator und Promotor) und dem N-Terminus des lacZ-Gens. Zwischen dem 6. und 7. Codon des lacZ-Gens befindet sich eine Polylinkerregion mit insgesamt zehn verschiedenen Restriktionsenzymkennungsstellen, verfügbar in beiden Richtungen (mp18 bzw. mp19). Eine Selektion erfolgt entsprechend dem LAMBDA gt11-Vektorsystem über die Inaktivierung der β -Galaktosidase.

3.5.2 Subklonierung der c-DNA in M13-RF-DNA

Für die Klonierung des 1,35 kBp großen c-DNA-Fragments des Physarum-Aktins wurde die M13-RF-DNA mit EcoRI gespalten und dephosphoryliert. Nach Ligation und anschließender Transformation kompetenter JM109-Zellen mit der rekombinanten ligierten M13-DNA konnten mehrere weiße Plaques isoliert werden. Exponentiell wachsende JM101-Zellen wurden mit den isolierten Phagen infiziert und für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert, der Überstand enthielt die rekombinanten M13-Phagen.

M-13-VECTOR - SYSTEM



Linearisierung der M13 RF-DNA im intergenen Bereich
(JG) mit Hae III

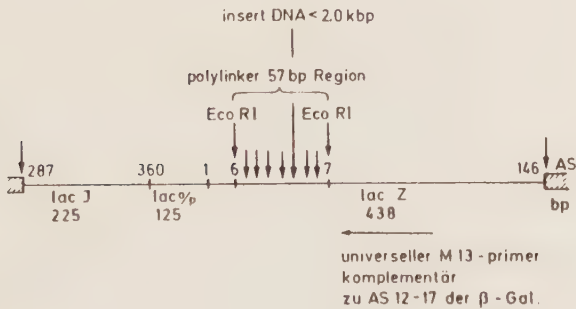


Abb. 19
Schematische Darstellung des M13mp19-Vektorsystems

Um zu überprüfen, ob die c-DNA in beiden Richtungen in den M13-Phagen subkloniert worden war, wurde ein einfaches Hybridisierungsexperiment durchgeführt. Jeweils 10 μ l zweier Überstände wurden zusammenpipettiert und in Gegenwart von 0,2%igem SDS und 10 mM EDTA für eine Stunde bei 65°C inkubiert. Eine anschließende Gelelektrophorese (0,7%ige Agarose) ergab, daß die beiden einzelsträngigen M13-DNA-Moleküle der Originalplaques P1 und P2 über das klonierte c-DNA-Fragment hybridisierten und eine zusätzliche höher molekulare Bande im Agarosegel zeigten. Somit war bewiesen, daß die c-DNA in den M13-Phagen P1 und P2 in entgegengesetzter Orientierung vorlag.

3.5.3 Isolierung und Sequenzierung rekombinanter einzelsträngiger M13-DNA

Aus den Überständen P1 und P2 wurde einzelsträngige rekombinante M13-DNA isoliert, die dann für die Didesoxysequenzierung zur Verfügung stand. In einem ersten Schritt wurde die einzelsträngige M13-DNA mit dem universellen M13-"Primer" inkubiert, einem synthetisch hergestellten Oligonukleotid, das komplementär zur kodierenden Sequenz der β -Galaktosidase im Bereich der Aminosäuren zwölf bis siebzehn ist. Nach erfolgter "Primer-Annealing"-Reaktion konnte in einem zweiten Schritt die Sequenzierungsreaktion gestartet werden. In vier Ansätzen pro DNA wurde eine DNA-Synthese mit dem Klenow-Fragment, dem Desoxy-NTP-Mix, radioaktivem ALPHA-³²S-dATP und jeweils einem Didesoxy-NTP durchgeführt. Nach einem Puls mit nichtradioaktivem Desoxy-NTP-Mix ("Chase"-Experiment) wurde die Reaktion gestoppt und auf einem 6%igen Polyacrylamidgel mit 8,3 M Harnstoff elektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 20a zeigt das Autoradiogramm dieser Sequenzierungsreaktion. Abb. 21 zeigt die daraus

abgeleitete Nukleotidsequenz. Vergleicht man die aus der Nukleotidsequenz der c-DNA abgeleitete Aminosäuresequenz mit der von Vandekerckhove 1978 publizierten Aminosäuresequenz des Physarum-Aktins (Abb. 22), findet man eine 100%ige Übereinstimmung der Sequenzen sowohl im N- wie auch im C-terminalen Bereich. Durch diese Sequenzanalyse bestätigte sich auch die Vermutung, eine c-DNA kloniert zu haben, die den gesamten kodierenden Bereich des Physarum-Aktins mit 5'- (10 Bp) und 3'- (200 Bp) flankierenden Sequenzen umfaßt.

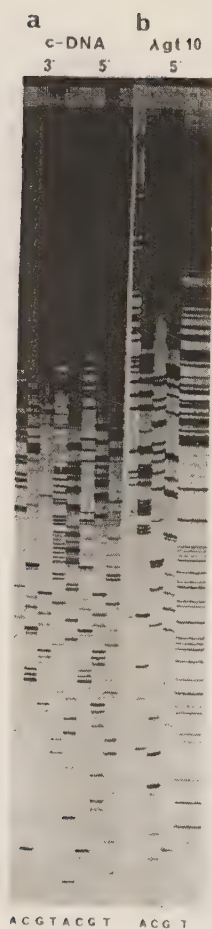


Abb. 20:

Autoradiogramme der Sequenzierungsreaktionen

(a) c-DNA: LAMBDA 8/2-Insert-DNA

(b) LAMBDA gt10: 900Bp-Fragment (P4-DNA, nachgeschnitten mit *Bst* III)

3' bzw. 5': Sequenz des 3'- bzw. 5'-Endes der klonierten DNA

Sequenzen

a) c-DNA

```

-10      met glu gly glu asp val gln ala leu val ile
5' - AAAAAAAAAACCGCA ATG GAA GGA GAA GAC GTT CAA GCT TTG GTT ATT
      1
asp asn gly ser gly met cys lys ala gly phe ala gly asp asp
GAC AAT GGC TCT GGC ATG TGC AAG GCT GGA TTT GCT GGC GAT GAT
      20

ala pro arg ala val phe pro ser
GCG CCC CGT GCC GTG TTC CCC TCA .....
      30      33
      ile ser lys glu glu tyr asp glu ser gly pro ser
..... ATC TCC AAA GAA GAG TAC GAC GAG TCA GGT CCC TCA
      356      360
ile val his arg lys cys phe end +10 +20
ATC GTC CAC CGC AAG TGC TTC TAA ACGCACCCAGTCGCTCCCATTGCTTAA
      370      374
+30 +40 +50 +60 +70
GTTGTTTGCTACTCGCCCGTCAATGAAGTGTCCCTTTACTTCCTT - 3'

```

Abb. 21:

Nukleotidsequenz der c-DNA für Physarum-Aktin (LAMBDA 8/2-Insert-DNA)

10 20
 X-Glu-Gly-Glu-Asp-Val-Gln-Ala-Leu-Val-Ile-Asp-Asn-Gly-Ser-Gly-Met-Cys-Lys-Ala-Gly-
 30 40
 Phe-Ala-Gly-Asp-Asp-Ala-Pro-Arg-Ala-Val-Phe-Pro-Ser-Ile-Val-Gly-Arg-Pro-Arg-His-
 50 60
 Thr-Gly-Val-Met-Val-Gly-Met-Gly-Gln-Lys-Asp-Ser-Tyr-Val-Gly-Asp-Glu-Ala-Gln-Ser-
 70 80
 Lys-Arg-Gly-Ile-Leu-Thr-Leu-Lys-Tyr-Pro-Ile-Glu-His-Gly-Ile-Val-Thr-Asn-Trp-Asp-
 90 100
 Asp-Met-Glu-Lys-Ile-Trp-His-His-Thr-Phe-Tyr-Asn-Glu-Leu-Arg-Val-Ala-Pro-Glu-Glu-
 110 120
 His-Pro-Val-Leu-Leu-Thr-Glu-Ala-Pro-Leu-Asn-Pro-Lys-Ala-Asn-Arg-Glu-Lys-Met-Thr-
 130 140
 Gln-Ile-Met-Phe-Glu-Thr-Phe-Asn-Thr-Pro-Ala-Met-Tyr-Val-Ala-Ile-Gln-Ala-Val-Leu-
 150 160
 Ser-Leu-Tyr-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Thr-Gly-Ile-Val-Met-Asp-Ser-Gly-Asp-Gly-Val-Ser-
 170 180
 His-Thr-Val-Pro-Ile-Tyr-Glu-Gly-Tyr-Ala-Leu-Pro-His-Ala-Ile-Leu-Arg-Leu-Asp-Leu-
 190 200
 Ala-Gly-Arg-Asp-Leu-Thr-Asp-Tyr-Leu-Met-Lys-Ile-Leu-Thr-Glu-Arg-Gly-Tyr-Ser-Phe-
 210 220
 Thr-Thr-Thr-Ala-Glu-Arg-Glu-Ile-Val-Arg-Asp-Ile-Lys-Glu-Lys-Leu-Ala-Tyr-Val-Ala-
 230 234a 239
 Leu-Asp-Phe-Glu-Gln-Glu-Met-Gln-Thr-Ala-Ala-Ser-Ser-Ser-Ala-Leu-Glu-Lys-Ser-Tyr-
 240 250
 Glu-Leu-Pro-Asp-Gly-Gln-Val-Ile-Thr-Ile-Gly-Asn-Glu-Arg-Phe-Arg-Cys-Pro-Glu-Ala-
 260 270
 Leu-Phe-Gln-Pro-Ser-Phe-Leu-Gly-Met-Glu-Ser-Ala-Gly-Ile-His-Glu-Thr-Thr-Tyr-Asn-
 280 290
 Ser-Ile-Met-Lys-Cys-Asp-Val-Asp-Ile-Arg-Lys-Asp-Leu-Tyr-Gly-Asn-Val-Val-Leu-Ser-
 300 310
 Gly-Gly-Thr-Thr-Met-Phe-Pro-Gly-Ile-Ala-Asp-Arg-Met-Gln-Lys-Glu-Leu-Thr-Ala-Leu-
 320 330
 Ala-Pro-Ser-Thr-Met-Lys-Ile-Lys-Ile-Ile-Ala-Pro-Pro-Glu-Arg-Lys-Tyr-Ser-Val-Trp-
 340 350
 Ile-Gly-Gly-Ser-Ile-Leu-Ala-Ser-Leu-Ser-Thr-Phe-Gln-Gln-Met-Trp-Ile-Ser-Lys-Glu-
 360 370
 Glu-Tyr-Asp-Glu-Ser-Gly-Pro-Ser-Ile-Val-His-Arg-Lys-Cys-Phe

Abb. 22:

AS-Sequenz des Aktins aus Physarum (Vandekerckhove, 1978a)

4. Klonierung Aktin-ähnlicher Sequenzen aus Physarum

Mit der nun zur Verfügung stehenden homologen Physarum-Aktin-c-DNA sollte es möglich sein, zusätzliche Aktin-ähnliche Sequenzen in der genomischen Physarum-DNA aufzufinden.

4.1 Isolierung hochmolekularer genomischer Physarum-DNA

Es wurde eine hochmolekulare genomische Physarum-DNA präpariert. Bei der Aufarbeitung von Mikroplasmodien mußte sehr darauf geachtet werden, bereits bei den ersten Isolierungsschritten den die Zellen umgebenden Schleim möglichst quantitativ zu entfernen. Die Physarum-Schleimhülle enthält Mucopolysaccharide, die sich hauptsächlich aus den Zuckerresten Galaktose, Rhamnose und Sulfatgruppen zusammensetzen. Diese negativ geladenen hochmolekularen Zuckermoleküle besitzen ähnliche biochemische Eigenschaften wie die ebenfalls negativ geladene DNA. DNA-Präparationen, die mit Kohlehydraten verunreinigt sind, können von Restriktionsenzymen praktisch nicht mehr gespalten werden.

4.1.1 Präparation von Kernen aus Physarum

Physarum-Kerne wurden aus drei Tage alten Mikroplasmodienkulturen isoliert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte in einem Puffer, der ähnlich dem Polysomenhomogenisationspuffer 0,25 M Sucrose enthielt. Ein relativ alkalischer pH von 8,0 sollte die Nuklease- und Protease-Aktivitäten vermindern. Magnesiumionen dienten zur Stabilisierung der Kerne während der Aufarbeitung. Darüberhinaus können divalente Kationen die Sulfatgruppen der Polysaccharide komplexieren und als Komplex durch anschließende präparative Zentrifugation und Filtration abgetrennt werden. Durch Zugabe des Detergens TritonX100 wurde zytoplasmatisches Material in Lösung gehalten. Nach Aufschluß der Zellen konnten in einer

Zentrifugation durch ein 1 M Sucrose-Kissen Kerne von Organellen abgetrennt werden: die Kerne pelletierten, die Organelle sedimentierten über der 1 M Sucroslösung.

4.1.2 Isolierung und Charakterisierung genomischer Physarum-DNA

Zur Isolierung der genomischen Physarum-DNA wurden die Kerne mit SDS und EDTA aufgebrochen. Durch eine anschließende Übernachtinkubation mit Proteinase K sollten Proteine, insbesondere Histone, teilweise abgebaut werden. Nach RNase-Behandlung wurden die Proteine durch wiederholte Phenol- und Chloroform-Extraktionen in die organische Phase beziehungsweise Interphase überführt. Als letzter Reinigungsschritt schloß sich eine isopyknische Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation an. Aus 40 g gepackten Mikroplasmodiumzellen konnten 200 µg hochmolekulare genomische Physarum-DNA isoliert werden. Abb. 23 zeigt die auf einem 0,8%igen Agarose-Gel aufgetrennte Physarum-DNA.

Das Verhältnis der optischen Dichte gemessen bei 260, 280 und 230 nm gibt einen Hinweis auf den Reinheitsgrad der isolierten DNA. Für das OD-Verhältnis 260/280 nm müssen Werte im Bereich von 1,8, für das OD-Verhältnis 260/230 nm von 2,0 erhalten werden. Für die Physarum-DNA konnten Werte von 1,7 bis 1,8 für das OD-Verhältnis 260/280 und 1,8 bis 2,0 für das OD-Verhältnis 260/230 bestimmt werden.

In einem weiteren Experiment wurde diese präparierte genomische Physarum-DNA mit den Enzymen EcoRI und HindIII geschnitten. 1 µg Physarum-DNA beziehungsweise 2 µg Dictyostelium-DNA (erhalten von Peter Hirt) wurden mit einem Überschuß an EcoRI (5 units) beziehungsweise HindIII (18 units) in Anwesenheit von Spermidin

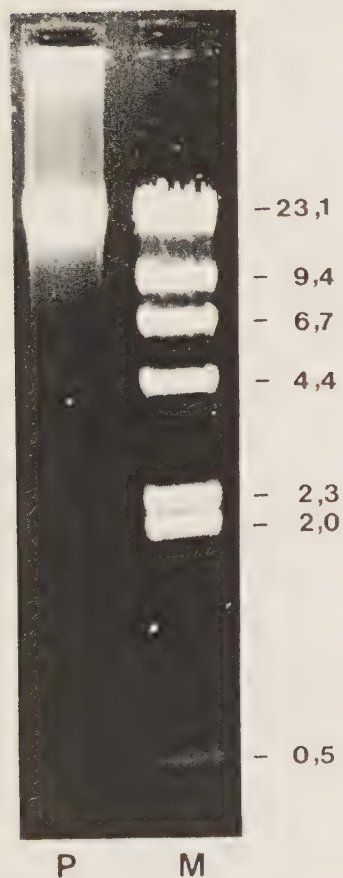


Abb. 23:
 Gelelektrophoretische Auftrennung genomischer Physarum-DNA (0,5 µg)
 Agarose)
 P: Physarum-DNA (2 µg)
 M: LAMBDA/HindIII (0,5 µg)

(10 mM Endkonzentration) inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 24 zeigt die komplette Spaltung dieser DNA-Präparationen. Die distinkten Banden nach Ethidiumbromid-Anfärbung entsprechen der rDNA, das heißt der DNA, die für ribosomale RNA kodiert. In Physarum wie auch in Dictyostelium liegen die Gene für ribosomale RNA als extrachromosomale palindromische Sequenzen in etwa 100 Kopien pro haploidem Genom vor.

4.2 Southernblotanalysen genomischer Physarum-DNA

In Southernblotanalysen mit gespaltener genomischer Physarum-DNA sollten zusammen mit der homologen Physarum-Aktin-c-DNA zusätzliche Aktin-ähnliche Sequenzen aufgefunden werden. Die dabei durchgeführte Strategie sah eine stufenweise Erniedrigung der Stringenz im Hybridisationspuffer vor. Die Stringenz sollte zum einen über die Formamidkonzentration, zum anderen über die Hybridisierungstemperatur variiert werden.

HindIII- beziehungsweise EcoRI-gespaltene genomische Physarum-DNA wurde auf einem 0,9%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 25) und auf Nitrocellulose transferiert. Zur Hybridisierung wurde das rekombinante pGem2 mit BamHI linearisiert (Abb. 17b). Mit der SP6-RNA-Polymerase und ALPHA-³²P-UTP wurden radioaktive "run-off"-Transkripte synthetisiert, die als homologe Physarum-Aktin-RNA-Sonde zusätzliche Signale im Autoradiogramm dieser Southernblotanalysen zeigen sollten (Abb. 26a+b). Hochstringente Bedingungen (50% Formamid, 60°C Hybridisierungstemperatur) zeigten im Autoradiogramm dasselbe Bandenmuster, das auch mit der Seeigel-Aktinprobe erhalten worden war (vgl. Abb. 13). Eine Erniedrigung der Stringenz durch geringere Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer oder niedrigere Temperatur während der

Hybridisierung führte tatsächlich zu zusätzlichen Banden im Röntgenfilm; im Falle der HindIII-Spaltung zu zwei zusätzlichen Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 6 beziehungsweise 6,5 kBp, im Falle der EcoRI-Spaltung zu einer zusätzlichen Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 4 kBp.

Das Interesse konzentrierte sich im weiteren auf die zusätzliche 4 kBp Bande, die nach EcoRI-Spaltung genomischer Physarum-DNA erhalten wurde. Zum einem war bisher keine EcoRI-Erkennungssequenz in Aktingenen von Dictyostelium (Firtel, 1984) oder Physarum (Nader et al., 1986) gefunden worden. Man konnte also davon ausgehen, daß diese 4 kBp große Bande einem intakten Aktigen und nicht nur einem Aktinfragment entspricht. Außerdem konnte ein genomisches DNA-Fragment von 4 kBp nicht nur die kodierende Region des Aktigenes (1,1 kBp), sondern auch mögliche Introns und flankierende Bereiche tragen und eignete sich damit für Studien über die genomische Organisation dieses Aktin- oder Aktin-ähnlichen Gens.

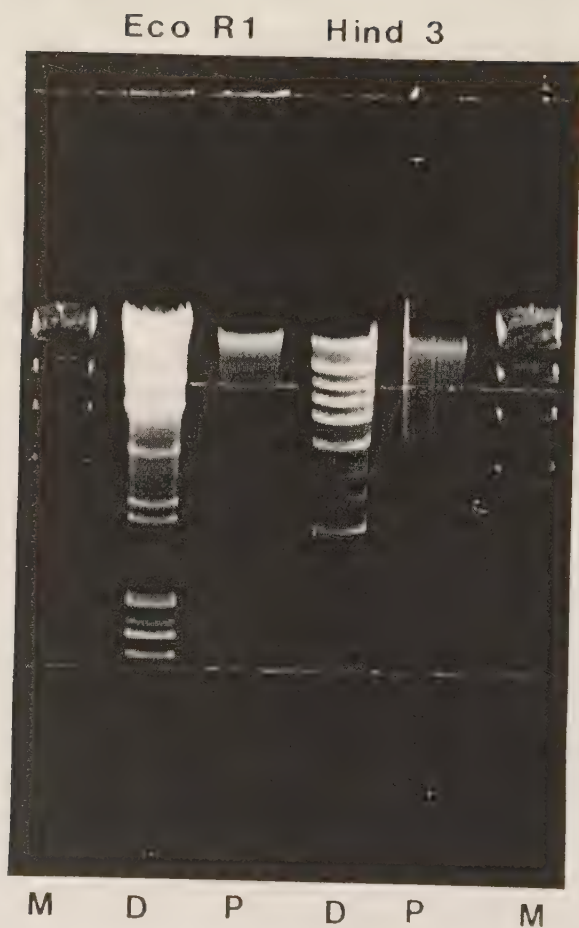


Abb. 24:

Gelelektrophoretische Analyse (0,5% Agarose) mit EcoRI (je 5 µl)
bzw. HindIII (je 10 µl) verdauter, genomischer Physarum- und
Dictyostelium-DNA
M: LADDER/HindIII
D: Dictyostelium-DNA (je 1 µg)
P: Physarum-DNA (je 2 µg)

The image shows the front cover of a book. The cover is dark, possibly black or dark brown, with a heavily textured, grainy surface. Along the right edge, there are several vertical, slightly raised ridges or binding elements, suggesting a traditional binding style. The overall appearance is aged and worn.

MHEHEE S HEHEHEHEHE

Abb. 25:
Gelelektrophoretische Auftrennung (0,9% Agarose) HindIII/EcoRI-
geschnittener, genomischer Physarum-DNA
M: LAMBDA /HindIII (0,5 ug)
H: HindIII-gespaltene Physarum-DNA (5 ug)
E: EcoRI-gespaltene Physarum-DNA (5 ug)
S: Seeigel Aktingen, genomisch, 3 kBp (0,5 ug)

M: LAMBDA /HindIII (0,5 ug)

H: HindIII-gespaltene Physarum-DNA (5 ug)

E: EcoRI-gespaltene Physarum-DNA (5 ug)

S: Seeigel Aktingen, genomisch, 3 kbp (0,5 ug)

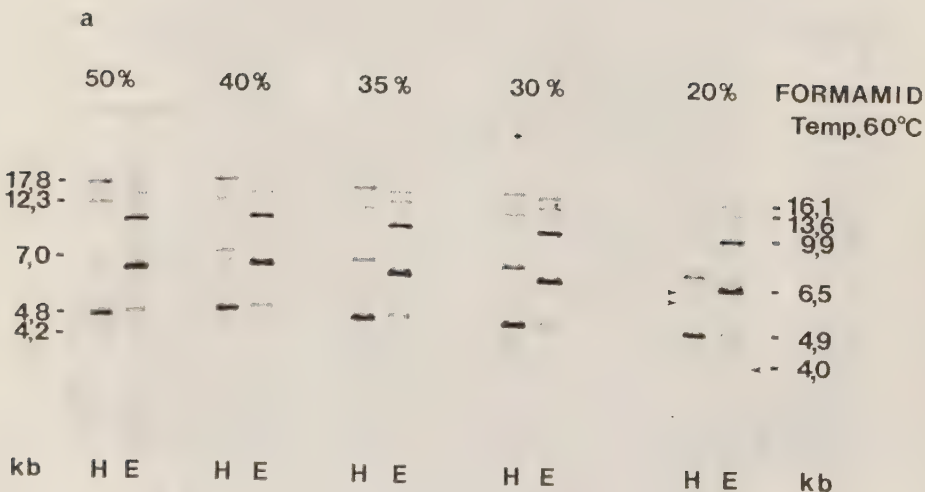
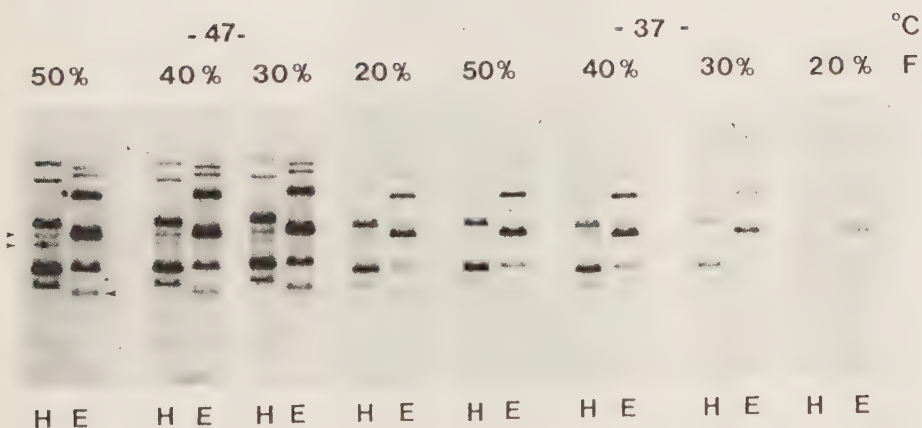


Abb. 26:
 Autoradiogramme der Southernblotanalysen mit radioaktiv
 markierter Physarum-Aktin-DNA (RNA-Transkript, markiert mit ALPHA
³²P-UTP, 5×10^6 cpm/ml Hybridisierungspuffer)
 (a) Hybridisierung unter hoher Stringenz:
 Hybridisierungstemperatur 60°C
 Hybridisierungspuffer 20% - 80% Formamid

b



b) Hybridisierung unter niedriger Stringenz
 Hybridisierungstemperatur 47°C/37°C
 Hybridisierungspuffer 20% - 50% FA
 H: HindIII-gespaltene genomische Physarum-DNA
 E: EcoRI-gspaltene genomische Physarum-DNA

4.3 Größenfraktionierung genomischer Physarum-DNA

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung EcoRI-geschnittener genomischer Physarum-DNA wurde der 4 kBp-Bereich über DE81-Ionenaustauschpapier eluiert. Abb. 27A zeigt den eluierten 4 kBp-Bereich zusammen mit einer EcoRI-geschnittenen Physarum-DNA-Fraktion. Eine Southernblotanalyse dieses Agarosegels sollte zeigen, ob dieser eluierte 4 kBp-Bereich tatsächlich die gesuchte 4 kBp-Bande beinhaltet. Nach Hybridisierung mit der transkribierten RNA-Probe konnte im Autoradiogramm (Abb. 27B) diese 4 kBp-Bande nachgewiesen werden.

4.4 Das LAMBDA gt10-Vektorsystem

Das Insertionsvektorsystem LAMBDA gt10 (Molekulargewicht: 43 kBp) besitzt die Möglichkeit, Fremd-DNA bis zu 7,6 kBp in die einzige EcoRI-Erkennungsstelle der Phagen-DNA zu klonieren. Im Gegensatz zum Insertionsvektor LAMBDA gt11, dessen EcoRI-Stelle im β -Galaktosidasegen liegt und eine Selektion aufgrund der Inaktivierung des Enzyms erfolgen kann, ist die singuläre EcoRI-Erkennungssequenz der LAMBDA gt10-Phagen-DNA im cI -Repressorgen lokalisiert. Alle Phagen, die den lytischen Infektionszyklus durchlaufen und klare Plaques auf E. coli-Rasen bilden können, stellen rekombinante Phagen dar. Ein $hflA$ -mutiertes Wirtsbakterium führt zu einer Verstärkung dieses Selektionsdruckes, da das bakterielle $hflA$ -Genprodukt wahrscheinlich für eine Protease kodiert, die das sogenannte LAMBDA cII -Repressorprotein als spezifisches Substrat erkennt (Cautsch und Wulff, 1974). Das LAMBDA cII -Genprodukt ist für die Expression des LAMBDA cI -Repressors verantwortlich. Die Protease $hflA$ führt somit zur Aufhebung des lysogenen Zustandes. Eine $hflA$ -Mutation gewährleistet die lytische Vermehrung ausschließlich rekombinanter Phagen.

A



M EcoRI

Abb. 27:

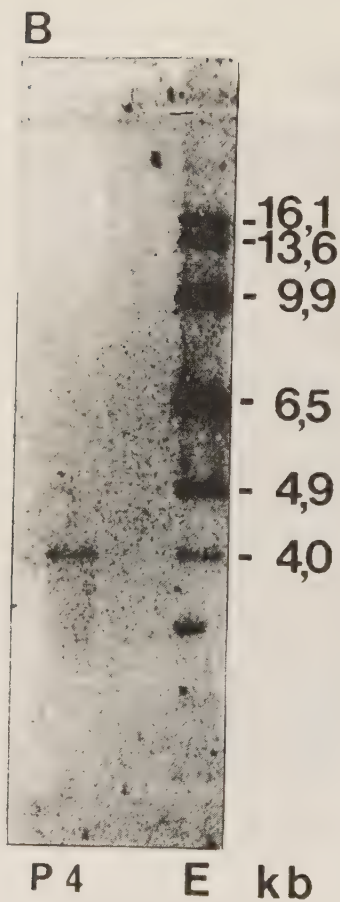
Größenfraktionierung chromosomaler Physarum-DNA

(A) Gelelektrophoretische Auftrennung (0,8% Agarose) folgender DNA:

M: LAMBDA /HindIII

EcoRI: linke und mittlere Spur: EcoRI-geschnittene, genomische Physarum-DNA

rechte Spur: eluierter 4 kbp-Bereich (P4), EcoRI-geschnittener genomischer Physarum-DNA



(B) Autoradiogramm der Southernblotanalysen von 27A (radioaktiv markierte Physarum-Aktin-RNA)
 P4: Größenfraktionierte Physarum-DNA nach EcoRI-Spaltung
 E: EcoRI-gespaltene, genomischer Physarum-DNA

4.5 Ligation und in vitro-Verpackung von LAMBDA gt10-DNA und größenfraktionierter Physarum-DNA

EcoRI-geschnittene LAMBDA gt10-DNA wurde mit der größenfraktionierten Physarum-DNA in einem Verhältnis von 10:1 mit einer DNA-Konzentration von 220 ug/ml im Reaktionsansatz ligiert. Nach in vitro-Verpackung der ligierten DNA wurden C600 hflA⁻-Zellen mit den rekombinanten Phagenpartikeln infiziert und ausplattiert. Die Klonierungseffizienz betrug $1,2 \times 10^8$ pfu/ug Insert-DNA.

4.6 Plaquehybridisierung und Aufreinigung spezifischer LAMBDA gt10-Klone

Zur Identifizierung spezifischer Klone wurden die Plaques auf Nitrocellulose transferiert und mit der ³²P-markierten Physarum-RNA hybridisiert. Das Screening erfolgte analog zum Screening der LAMBDA gt11-Genbank (siehe 3.2). Abb.28 zeigt die Autoradiogramme der Plaquehybridisierung und Aufreinigung positiver LAMBDA gt10-Klone. Eine LAMBDA-DNA-Minipräparation und anschließende EcoRI-Spaltung der Klone 2/31, 2/32, 6/11 und 6/12 gab Aufschluß über die Größe des Physarum-DNA-Fragments. Abb. 29 zeigt die gelelektrophoretisch aufgetrennten EcoRI-Spaltprodukte. Bei allen vier untersuchten Klonen konnte ein 4 kBp großes DNA-Fragment nachgewiesen werden. Allerdings mußten bei allen vier getesteten Klonen mehrfache Deletionen dieses 4 kBp großen Inserts festgestellt werden. Ein Großteil der 4 kBp-Bande (circa 50%) war zu einem 3 kBp großen DNA-Fragment deletiert worden. Für die Erstellung der LAMBDA gt10-Unterbibliothek wurde mit dem C600 hflA⁻, einem recA⁺ E. coli-Stamm gearbeitet. Das intakte bakterielle Rekombinationssystem könnte für die aufgetretenen Deletionen verantwortlich gemacht werden. Zur näheren Charakterisierung des deletierten und des vollständigen klonierten DNA-Fragments wurde die

LAMBDA-DNA des Klonen 2/32 analog der LAMBDA gt11-Präparation (Kap. 3.3) isoliert.

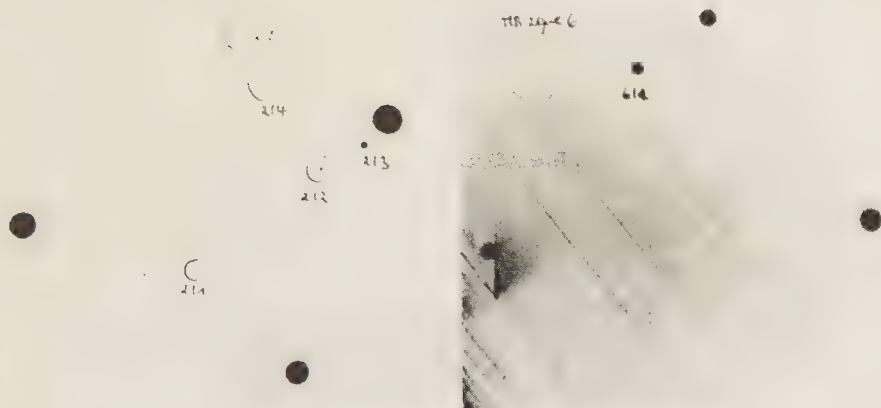
4.7 LAMBDA gt10-DNA-Präparation eines positiven Klonen

Nach EcoRI-Spaltung der isolierten LAMBDA gt10-DNA wurden die EcoRI-Fragmente auf einem 0,9%igen Agarosegel aufgetrennt, das 4 kbp und das 3 kbp große Fragment elektroeluiert und auf mögliche Restriktionsschnittstellen untersucht.

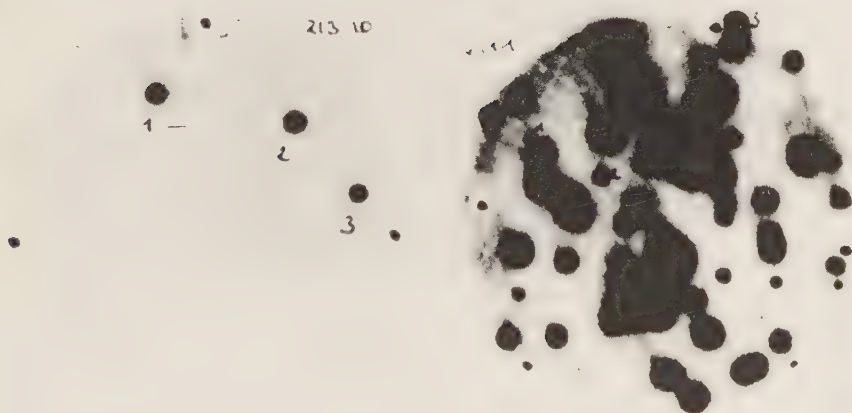
4.7.1 Kartierung des klonierten Inserts

Die beiden isolierten Physarum-DNA-Fragmente wurden mit den Restriktionsendonukleasen HincII, SacI, HindIII und AvaI gespalten und auf einem 1,3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Während das deletierte Physarum-DNA-Fragment keine Erkennungssequenz für die Enzyme SacI und AvaI zu besitzen scheint, spalten die Endonukleasen HincII und HindIII die Physarum-DNA in zwei kleinere DNA-Fragmente mit dem Molekulargewicht 500 beziehungsweise 900 Bp für das jeweils kleinere und 2,5 beziehungsweise 2,1 kbp für das jeweils größere Fragment (Abb. 30A). Das Gel wurde auf Nitrocellulose transferiert und mit der radioaktiv markierten Physarum-RNA-Aktin-Sonde hybridisiert. Das Autoradiogramm (Abb. 30B) bestätigt zum einen das Fehlen einer SacI- beziehungsweise AvaI-Schnittstelle und zeigt zum anderen nur im Falle der HindIII-Spaltung deutliche Signale für das 900 Bp beziehungsweise 2,1 kbp große Fragment. Nur HindIII scheint eine Erkennungssequenz im kodierenden Bereich des klonierten Physarum-Aktin-ähnlichen Gens zu besitzen. Auch in der Physarum-Aktin-c-DNA war eine HindIII-Erkennungssequenz nachgewiesen worden (siehe 3.4.3). Somit konnte angenommen werden, ein zusätzliches Physarum-Aktin-

a



b



1. rescreen

Abb. 26:
Screening der LAMBA gt10 C₃ (cm)/p₂ (cm) / 7/11 in
a: Plaquehybridisierung
b: Plaqueaufreinigung positiver Klone

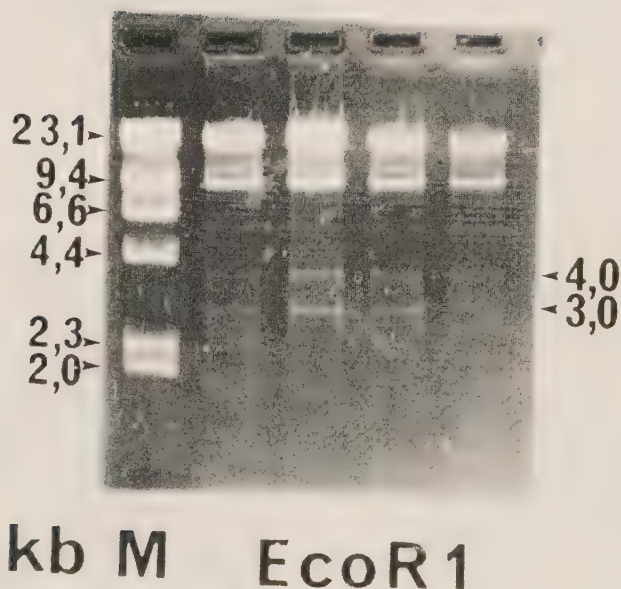


Abb. 29: Gelelektrophoretische Analyse (0,8% Agarose) rekombinanter Phagen-DNA (LAMBDA gt10 mit großextraktionierter Physarum-DNA (P4))
M: LAMBDA /HindIII
EcoR1: EcoRI geschnittene Phagen-DNA (je 1 µg) vier verschiedener positiver Klone

beziehungsweise Aktin-ähnliches Gen kloniert zu haben. Das kodierende Sequenzen enthaltende 0,9 kbp große EcoRI/HindIII-Fragment der im LAMBDA gt10-Vektor klonierten 4 kbp-Bande sollte nun in den M13-Phagen subkloniert werden (vergleiche 3.5.2).

4.7.2 Subklonierung in M13 und Sequenzierung

Zur Subklonierung des 900 Bp großen DNA-Fragments wurde die RF-M13-DNA mit EcoRI und HindIII gespalten. Die anschließende Ligation der so behandelten Vektor-DNA erfolgte entsprechend der in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Subklonierung der c-DNA in den M13-Phagen. Abb. 20b zeigt die analog durchgeführte Sequenzierungsreaktion und Abb. 31 die daraus abgeleitete Nukleotidsequenz. Für das ursprünglich in LAMBDA gt10 klonierte 900 Bp- große DNA-Fragment konnten Aktin-spezifische Sequenzen identifiziert werden. Die HindIII-Schnittstelle der klonierten 4 kbp Bande entspricht der konservierten HindIII-Schnittstelle des Aktins im Kodon sieben und acht. Das 900 Bp große DNA-Fragment enthält die ersten sechs Kodons eines Aktins und den 5'-stromaufwärts flankierenden Bereich mit den für die Initiation der Transkription eukaryotischer Gene notwendiger Regulationssequenzen, der CAAT-Stelle und der TATA-Box. Wie bereits erwähnt wurde (siehe 4.6, Diskussion), ergeben sich enorme Schwierigkeiten bei der Subklonierung genomischer Physarum-DNA.

Für eine weitere Charakterisierung der kompletten 4 kbp großen DNA-Bande müssen Klonierungsexperimente mit rec⁻-E.coli-Stämmen durchgeführt werden. Erst dann wird es möglich sein, Subklone mit nicht deletierten Physarum-DNA-Fragmenten für nachfolgende Sequenzanalysen zu erhalten.

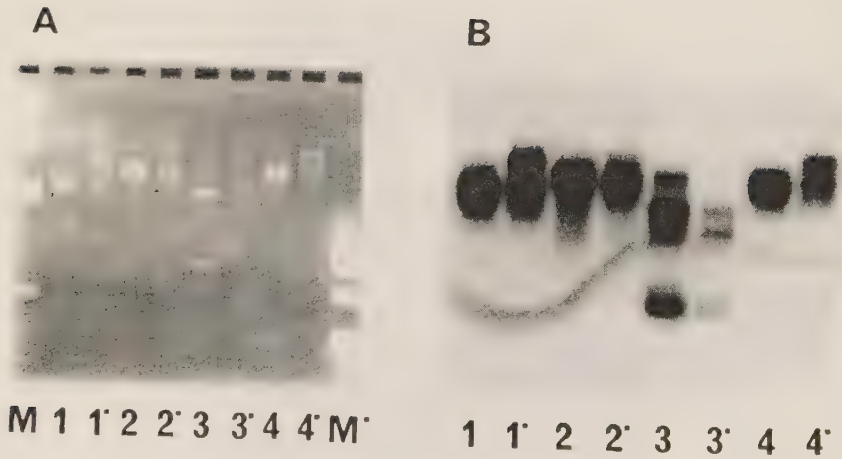


Abb. 30: Restriktionsanalyse der klonierten P4-DNA
 (A) Gelelektrophoretische Auftrennung (1,3% Agarose) deletierter (Zahl ohne Markierung) bzw. undeletierter (Zahl mit Markierung), klonierter P4-DNA (je 0,2 ug)

(B) Autoradiogramm der Southernblotanalyse von Abb. 30A

M: LAMBDA /HindIII

1: HincII-gespaltene DNA

2: SacI-gspaltene DNA

3: HindIII-gespaltene DNA

4: Aval-gespaltene DNA

M: 0 x174/HaeIII

b) λ gt10 - 900 bp Fragment

-140	-130	-120	-110	-100	-90
5' - GCCTATCTT CCAATCT TTAACATTCCCCAAAAATATTATTCCTCACGTAGCA					
	caat-site				
-80	-70	-60	-50	-40	
ATTGAGAATGACAAA GGATAAAAGT TGCCGTTTGTCTAGCCTTTTGTAGTTTC					
	tata-box				
-30	-20	-10	met glu gly glu		
CAAAAGGACAAGCAACTAGCAAACATCACATAAGCA			ATG	GAA	GGA GAA
				1	
asp val gln					
GAC GTT CAA GC - 3'					
Hind-3					

D. DISKUSSION

1. Biochemische Charakterisierung der F-Aktin-Cappingproteine aus Physarum

Zur Charakterisierung der F-Aktin-Cappingproteine aus Physarum polycephalum wurden sowohl biochemische als auch immunologische Analysen durchgeführt. Zuvor war sichergestellt worden, daß die gereinigten Proteinpräparationen nicht mit einem weiteren Cappingprotein kontaminiert waren (Maruta et al., 1984). Es wurde gezeigt, daß alle vier Proteine (cap42(a), cap42(b), Fragmin und Aktin) ein Molekulargewicht von 42 kd besitzen. Nach Bestimmung der elektrischen Ladung der vier Proteine wurden jedoch Unterschiede deutlich: für Aktin und cap42(b) wurde ein isoelektrischer Punkt von 5,4, für cap42(a) und Fragmin ein etwas basischerer isoelektrischer Punkt von 6,1 bestimmt. Tryptische Peptidmuster der vier Proteine wurden miteinander verglichen: die jeweils den gleichen isoelektrischen Punkt besitzenden Proteine Aktin und cap42(b) bzw. Fragmin und cap42(a) zeigten ein fast identisches Aufspaltungsmuster. Die tryptischen Spaltpeptide von Aktin bzw. cap42(b) unterschieden sich dagegen sehr deutlich von denen der Proteine Fragmin und cap42(a). Aufgrund dieses Verhaltens wurden die vier untersuchten Proteine in eine Untergruppe A (Aktin, cap42(b)) und eine Untergruppe B (Fragmin, cap42(a)) eingeteilt.

Mit polyklonalen Antikörpern, die gegen die einzelnen vier Proteine gerichtet waren, konnten Kreuzreaktivitäten aller 42 kd Proteine aus Physarum untereinander nachgewiesen werden (siehe C.2.2.3). Dieser Befund ließ den Schluß zu, daß die Proteine Aktin, cap42(a), cap42(b) und Fragmin gemeinsame antigene Determinanten besitzen müssen. Die immunologischen Daten deuteten

daraufhin, daß die drei F-Aktin-Cappingproteine Epitope gemeinsam, haben, die dem Aktinmolekül fehlen.

Innerhalb der Gruppe der F-Aktin-Cappingproteine sind sich Fragmin und cap42(a) sehr ähnlich. Das Aktin-Bindungsprotein cap42(b) scheint dagegen große Ähnlichkeit mit Aktin zu besitzen. Erste Aminosäuresequenzanalysen deuten auf eine über 90%ige Homologie zwischen cap42(b) und Aktin hin (Vandekerckhove, persönliche Mitteilung). Damit konnte zum ersten Mal ein Aktin-Bindungsprotein beschrieben werden, welches eine hohe Strukturhomologie zu Aktin selbst besitzt. Die Strukturhomologie zwischen cap42(b) und Aktin läßt den Schluß zu, daß sich auf Nukleotidebene ein ursprünglich für Aktin kodierendes Gen im Laufe der Evolution möglicherweise durch Duplikation und nachfolgende Mutation oder Rekombination zu einem Aktin-ähnlichen Gen entwickelt haben könnte. Das auf diese Weise entstandene Genprodukt hätte demnach zwar die Fähigkeit zur Polymerisation verloren, die Aktin-Bindungsregion jedoch behalten.

Durch die folgende Hypothese könnte die Entstehung eines F-Aktin-Cappingproteins, welches Einfluß auf den Polymerisationszustand des Aktins nehmen kann, erklärt werden: Das cap42(b)-Monomer wird während der Aktin-Polymerisation als ein Aktin-analoges Protein akzeptiert und kann infolgedessen an ein Ende des F-Aktin-Filaments binden. Die Substitution einiger weniger Aminosäuren innerhalb dieser Aktin-Variante führt dann wahrscheinlich dazu, daß eine Inkorporation weiterer Aktin-Monomere verhindert wird. Durch weitere Aminosäuresubstitutionen kann die Aktin-Variante zusätzliche regulatorische Stellen erhalten haben, wie z.B. die Phosphorylierungs- oder die Calcium-Bindungsstelle.

Für diese hier zitierten Hypothesen gibt es bereits experimentelle Hinweise aus anderen Systemen. So wurde zum Beispiel im

Drosophila- Aktinen act88F eine Nonsense- Mutation beschrieben, deren Genprodukt ein um zwanzig Aminosäuren verkürztes Aktin ist (Karlik, 1984). Die Inkorporation dieser Aktin-Isoform in die Aktin-Filamente des Flugmuskels führte zu einer Unterbrechung der Myofibrillenbildung. Auch in Dictyostelium ist inzwischen der kodierende Bereich eines Aktin-ähnlichen Gens sequenziert und mit Sequenzen anderer Aktin-kodierender Gene aus Dictyostelium verglichen worden (Romans und Firtel, 1985). Das identifizierte Gen zeigt im kodierenden Bereich deutliche Sequenzunterschiede zum normalen Aktinen. Es konnte eine nur 87,7%ige Homologie festgestellt werden. Im weiteren besitzt dieses Aktin-ähnliche Gen zwölf zusätzliche Nukleotide am 3'-Ende des kodierenden Bereichs. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz wird für eine unterschiedliche Sekundärstruktur dieses Genprodukts im Vergleich zum normalen Aktin verantwortlich gemacht. Es wird diskutiert, ob diese beschriebene Aktin-Variante aus Dictyostelium ebenso wie cap42(b) aus Physarum (Maruta et al. 1984) nicht mehr polymerisiert, oder eine weitere Polymerisation des F-Aktinfilaments durch eine Cappingaktivität verhindert.

Da im Physarum-Genom eine Multigenfamilie für mindestens vier nicht verknüpfte Aktin-Loci nachgewiesen wurde (Schedl und Dove, 1982), liegt die Vermutung nahe, daß eventuell eines dieser vier Aktingene für das Aktin-ähnliche Protein cap42(b) kodiert. Falls innerhalb dieser Aktinmultigenfamilie ein Gen für eine funktionell unterschiedliche Aktin-Variante kodiert, wäre dies ein eindrucksvolles Beispiel dafür, wie auf sehr ökonomische Weise ein Regulationsmechanismus für die Aktin-Polymerisation entstanden sein könnte, ohne notwendigerweise neue Proteine zu entwickeln. Weiterhin besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß noch zusätzliche Aktin-ähnliche Sequenzen in der genomischen

Physarum-DNA vorhanden sind, die mit heterologen Aktin-Sonden, welche allen bisher durchgeführten Analysen über Aktinsequenzen aus Physarum zu Grunde lagen (Schedl und Dove, 1982; Pierron et al., 1984), nicht identifiziert werden konnten.

2. Isolierung und Charakterisierung einer Aktin-c-DNA aus Physarum

Die Isolierung eines Aktingens oder einer Aktin-c-DNA aus Physarum war die Voraussetzung dafür, eventuell zusätzlich zu den bereits charakterisierten Aktingenen (Schedl und Dove, 1982) weitere Aktin-ähnliche Sequenzen in der chromosomalen Physarum-DNA aufzufinden.

Aus einer LAMBDA gt11-Physarum-cDNA-Genbank konnte nach Hybridisierung mit einer Seeigel-Aktin-DNA ein positiver Klon identifiziert werden. Die EcoRI-Spaltung der Phagen-DNA ergab ein 1,35 kBp großes Insert, das mit der Seeigel-Aktin-DNA-Sonde hybridisierte. Die Sequenzierung des 5'- bzw. des 3'-Endes dieser isolierten c-DNA erbrachte den Beweis, daß diese c-DNA den gesamten kodierenden Bereich eines Aktingens (1,1 kBp), zusammen mit 5'- (10 Bp) und 3'- (200 Bp) flankierenden Sequenzen enthielt.

Diese Physarum-Aktin-c-DNA konnte nun als spezifische Hybridisierung-Sonde eingesetzt werden. Mit heterologen Aktin-Sonden waren zuvor in Southernblotanalysen genomischer Physarum-DNA (HindIII/EcoRI) jeweils fünf Banden identifiziert und vier nicht-verknüpften Aktin-Loci zugeordnet worden (Schedl und Dove, 1982).

Es wurde angenommen, daß eine deutliche Sequenzhomologie zwischen dem Aktin- und dem Aktin-ähnlichen-Gen sowie ein für Physarum spezifischer Codon-Gebrauch existiert. Für die Experimente wurde

die Vermutung zu Grunde gelegt, daß mit der isolierten Aktin-c-DNA und unter nicht-stringenten Hybridisierungsbedingungen Aktin-ähnliche Sequenzen im Physarum-Genom aufgefunden werden können.

Um eine zusätzliche Erhöhung der Empfindlichkeit im Hybridisierungstest zu erreichen, wurde die c-DNA in den Plasmid-Vektor pGem2 umkloniert. Das Plasmid pGem2 besitzt Promotoren für die RNA-Polymerasen SP6 bzw. T7, so daß es möglich ist, ein radioaktiv markiertes RNA-Transkript der klonierten DNA herzustellen. Da RNA/DNA-Hybride thermodynamisch stabiler sind, als die entsprechenden DNA/DNA-Komplexe, sollten mit einer RNA-Sonde mögliche Nukleotidunterschiede zwischen dem Aktin- und dem Aktin-ähnlichen Gen besser kompensiert werden können.

Unter stringenten Hybridisierungsbedingungen konnte mit der Physarum-spezifischen Aktin-RNA zunächst das publizierte Aktin-Bandenmuster geschnittener genomischer Physarum-DNA bestätigt werden. Darüber hinaus konnte aber unter nicht-stringenten Hybridisierungsbedingungen nach EcoRI-Spaltung genomischer Physarum-DNA eine sechste zusätzliche 4 kBp große Bande nachgewiesen werden, die in der Literatur noch nicht beschrieben worden war. Bei diesem DNA-Fragment kann es sich um ein weiteres Aktinogen oder aber um ein verändertes Aktinogen handeln, dessen Nukleotidsequenz nicht homolog genug ist, um mit heterologen Aktin-Sonden erkannt werden zu können.

3. Versuche zur Klonierung und Sequenzierung einer Aktin-ähnlichen Sequenz aus Physarum

Zur Klonierung der zusätzlich identifizierten 4 kBp-Bande wurde eine Unterbibliothek größenfraktionierter EcoRI-geschnittener Physarum-DNA angelegt. Der LAMBDA gt10-Insertionsvektor mit einer Klonierungskapazität von bis zu 7,6 kBp besitzt eine einzige

EcoRI-Erkennungsstelle im cI-Repressorgen und erfüllte damit die Voraussetzung zur Klonierung des 4 kbp großen EcoRI-Fragments, das die neuentdeckte Aktin-ähnliche Sequenz trägt. Bei diesem Vektor wird üblicherweise das rec⁺ E.coli-Bakterium C600 hflA⁻ als Wirtsstamm benutzt. Die hflA-Mutation (vgl. C.4.4) ermöglicht eine Selektion auf rekombinante Klone.

Mit Hilfe des Vektor/Wirt-Systems LAMBDA gt10/C600 hflA⁻ war es bereits gelungen (Monteiro und Cox, 1986), größenfraktionierte genomische Physarum-DNA zu klonieren und daraus das Physarum-Aktin gen ardC zu isolieren, das sich auf einem 4,5 kbp großen HindIII-Restriktionsfragment befand.

Auch die Klonierung des neugefundenen 4 kbp großen EcoRI-Fragments wurde mit diesem Vektor/Wirt-System erfolgreich durchgeführt. Nach Hybridisierung mit der Physarum-spezifischen Aktin-RNA-Sonde konnten mehrere positive LAMBDA gt10-Klone isoliert werden. Eine Analyse der Phagen-DNA dieser Klone zeigte jedoch vielfache Deletionen im klonierten Fragment (Abb. 32). Nur ein 900 Bp großes HindIII/EcoRI-Unterfragment wurde stabil in den Bakteriophagen M13 subkloniert. Wie die Sequenzanalyse zeigte, enthielt dieses DNA-Fragment einen kodierenden Bereich sowie die 5'-stromaufwärts flankierende Region mit den für die RNA-Polymerase II bekannten Promotorsequenzen (Gilbert, 1976). 70 Bp 5'-stromaufwärts vom Startpunkt der Transkription konnte die sogenannte TATA- oder "Hogness"-Box, die Erkennungsstelle für die RNA-Polymerase II, identifiziert werden (die "Pribnow"-Box übernimmt die entsprechende Aufgabe im prokaryotischen System). Eine weitere wichtige Regulationssequenz der eukaryotischen Transkription, die CAAT-Stelle, konnte 130 Bp 5'-stromaufwärts vom Transkriptionsstart nachgewiesen werden. Die relative Lage zum Transkriptionsstart dieser beiden Konsensus-Sequenzen

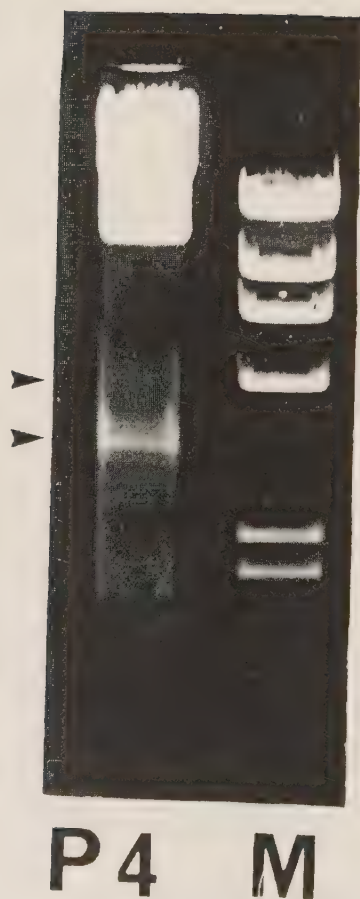


Abb. 32:
 Gelelektrophoretische Auftrennung klonierter größenfraktionierter
 Physarum-DNA
 P4: *SacPI*-gespaltene, rekombinante LAMBDA qt10-DNA eines positiven
 Klon (vgl. Abb. 29, 30)
 M: LAMBDA /HindIII

innerhalb des isolierten Physarum-DNA-Fragments entsprach der relativen Lokalisation von Aktinpromotoren aus anderen Systemen. Für das Aktinogen aus Acanthamoeba konnte eine TATA-Box (-78 Bp) und eine CAAT-Stelle (-115 Bp) identifiziert werden (Nellen und Gallwitz, 1982). Für die Aktinogene in Dictyostelium wurde eine TATA-Box (-70 Bp) bestimmt (Nellen et al., 1984).

Die Sequenzanalyse zeigte außerdem, daß das 900 Bp große DNA-Fragment den 5' kodierenden Bereich eines Aktingens enthielt. Die ersten sechs Kodons 3'-stromabwärts vom Startkodon AUG entsprechen dem N-terminalen Ende des Proteins Aktin aus Physarum (Vandekerckhove und Weber, 1978).

Es wurde eine fast 100%ige Homologie der sequenzierten DNA mit dem 5'-Ende des sequenzierten Aktingens ardA (Nader et al., 1986) festgestellt, welches sowohl durch Mendel-(Schedl und Dove, 1982) als auch durch Sequenz-Analysen (Nader et al., 1986) definiert wurde. Das 3'-Ende des ardA-Gens stellt eine genspezifische Sequenz dar, da sich diese Sequenz in Southernblotanalysen genomischer Physarum-DNA nur in einem ardA-spezifischen Restriktionsfragment nachweisen läßt (Nader, persönliche Mitteilung). Daher könnte es sich bei der analysierten DNA um ein rekombiniertes Gen handeln, bei dem 5'-Sequenzen des Aktingens ardA mit Exons anderer Physarum-Aktinogene verknüpft worden sind. Im ardA-Gen konnten fünf Introns nachgewiesen werden (Nader et al., 1986). Es wird spekuliert, daß sich Gene durch Verknüpfung von Exons zu einer funktionellen Einheit entwickelt haben könnten (Gilbert, 1978) und daß das Ursprungsaktinogen von bis zu zwanzig Introns unterbrochen war. Die Existenz von Introns im Physarum-Aktinogen ardA läßt die Vermutung zu, daß durch Rekombinationsereignisse verschiedener Aktinexons ein Aktin-ähnliches Gen mit einem funktionell veränderten Genprodukt

entstanden sein könnte.

Hinweise, daß neue Gene durch die Verknüpfung bereits vorhandener Exons entstanden sein könnten, existieren auch für eine andere Multigenfamilie (Lewin, 1983). Die Sauerstoff-bindenden Proteine Myoglobin, Leghämoglobin und die alpha- bzw. beta - Untereinheiten des Globinmoleküls haben sich wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Ursprungsgen durch Duplikation beziehungsweise durch Rekombinationsereignisse entwickelt. Das Leghämoglobingen besteht aus vier kodierenden Exon- und drei nicht kodierenden Intron-Bereichen. Durch die Verknüpfung zweier Exons dieses Leghämoglobingens sind wahrscheinlich im Laufe der Evolution die Gene für das Myoglobin und für die beiden Globinuntereinheiten entstanden, für die nur drei Exons und zwei Introns bestimmt worden sind. Andererseits haben sich die beiden Untereinheiten des Globinmoleküls eventuell durch Duplikation des Myoglobingens entwickelt.

4. Instabilitäten bei der Klonierung genomischer Physarum-DNA

Voraussetzung für eine weitere Analyse der hier beschriebenen Aktin-ähnlichen Sequenz ist die stabile Klonierung und Subklonierung des gesamten 4 kBp großen EcoRI-Fragments. Von anderen Autoren (Nader et al., 1985) konnte gezeigt werden, daß für die Klonierung von etwa 80% der Physarum-DNA mit einem speziellen recBC⁻, sbcB⁻-Wirtsstamm und einem red⁻ LAMBDA-Vektor gearbeitet werden muß. Auch für andere Systeme (Drosophila-Genom, menschliche DNA) ist die Notwendigkeit dieses speziellen Vektor/Wirt-Systems für eine stabile Klonierung bestimmter DNA-Sequenzen beschrieben worden (Petri und Wyman, 1985; Wyman et al., 1985).

Als Gründe für aufgetretene Instabilitäten wurden palindromische

Sequenzen ab einer Größe von 60 Bp diskutiert (Nader et al., 1985; Wyman et al., 1985). In der Sekundärstruktur der DNA können palindromische Sequenzen zur Ausbildung sogenannter Haarnadel- (hairpin) oder "fold back"-Strukturen führen. Haarnadelstrukturen besitzen an den Übergängen zur Doppelhelix lokalisierte Einzelstrangbereiche, die Ähnlichkeiten zur sogenannten "Holliday"-Struktur eines "Crossing-over"-Ereignisses aufweisen und deshalb von den wirtskodierten Rekombinationsexonukleasen I und V (die recBC- und sbcB-Genprodukte) erkannt und abgebaut werden könnten (Leach und Stahl, 1983; Collins et al., 1982).

Kürzlich wurden AT- und GC-Homopolymere im Physarum-Aktinogen *ardA* charakterisiert, die ähnlich den Palindromen zu Instabilitäten und Deletionen der klonierten DNA führen (Nader et al., 1986). Diese Homopolymere treten in einer bestimmten symmetrischen Anordnung in den Introns dieses Gens auf. Es wird diskutiert, daß in der rekombinanten Phagen-DNA unter Torsionsstreß einzelsträngige Regionen im Bereich der Homopolymere induziert werden, die dann von den E.coli Exonukleasen I und V erkannt werden könnten.

Auch das phagenkodierte red-Genprodukt, eine Exonuklease, könnte für die beobachteten Deletionen der klonierten Physarum-DNA verantwortlich gemacht werden, auch wenn die spezifische Rolle dieser LAMBDA-Exonuklease im Rahmen der Phagenrekombination noch nicht aufgeklärt werden konnte (Smith, 1983).

Der zur Verfügung stehende red-Phage EMBL3, ein Substitutionsvektor, akzeptiert nur DNA-Inserts von mehr als 10 kBp. Da für die Klonierung der im Southernblot genomischer Physarum-DNA zusätzlich identifizierten Bande größenfraktionierte, circa 4 kBp große Physarum-DNA verwendet wurde, konnte dieser Vektor zur Klonierung der Aktin-ähnlichen

Sequenz aus Physarum nicht verwendet werden. Auf Grund der geringeren Klonierungskapazität von Insertionsvektoren wurde der Phagenvektor LAMBDA gt10 gewählt, der keine zusätzliche Mutation im red-Genort besitzt. Zur Selektion rekombinanter cI-Insertionsvektoren ist eine hflA-Mutation des Wirtsstamms erforderlich. Der Wirt CES200 besaß zwar die geforderten Mutationen recBC⁻ und sbcB⁻, wies jedoch keine Mutation im hflA-Genort auf und konnte daher zur LAMBDA gt10-Klonierung der größenfraktionierten Physarum-DNA nicht verwendet werden.

Um eine stabile Klonierung der Aktin-ähnlichen Physarum-DNA durchzuführen, müßte zunächst eine zusätzliche hflA-Mutation in einem recBC⁻, sbcB⁻-Wirt eingeführt werden. Mit diesem genetisch neuen Stamm und einem red-cI-Insertionsvektor (zum Beispiel NM 641; Murray et al., 1977) wären die Voraussetzungen geschaffen, die bisherigen Probleme der Instabilität bei der Klonierung von genomischer Physarum-DNA zu lösen.

Zusätzliche Probleme sind aber auch bei der anschließenden Sequenzierung zu erwarten, da auch bei der Herstellung von Subklonen im Bakteriophagen M13 Instabilitäten beobachtet wurden. Bei der Sequenzierung des Physarum-ardA-Gens konnten diese Schwierigkeiten nur durch den Einsatz einer äußerst komplexen Subklonierungsstrategie vermieden werden (Nader et al., 1986).

Die vollständige DNA-Sequenz des Aktin-ähnlichen Gens aus Physarum würde es ermöglichen, Aussagen über den Aufbau und die mögliche Entwicklung dieses Gens aus einem Ursprungsaktinogen zu treffen. Gegenwärtig werden die Aminosäuresequenzen der F-Aktin-Cappingproteine aus Physarum (Vandekerckhove, Belgien) erstellt. Erst nach der Aminosäuresequenzanalyse wird eine Zuordnung der Aktin-ähnlichen DNA-Sequenz mit einem Aktin-Bindungsprotein (eventuell cap42(b)) möglich sein.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Der azelluläre Schleimpilz Physarum polycephalum ist auf Grund der bei ihm zu beobachtenden oszillierenden Zytoplasmaströmung ein geeignetes Modellsystem, um die molekularen Grundlagen der Zellmotilität zu untersuchen.

Zellbewegungen, wie die Zytoplasmaströmung, werden auf Polymerisations- und Depolymerisations- Vorgänge des Zytoskelettproteins Aktin zurückgeführt. Allgemein wird die Aktin-Polymerisation ihrerseits durch Aktin-Bindungsproteine reguliert. Auch aus Physarum konnten Aktin-Bindungsproteine, z.B. sogenannte endblockierende Cappingproteine, isoliert werden (vgl. A.1).

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse der biochemischen, immunologischen und genetischen Analysen der aus Physarum isolierten F-Aktin-Cappingproteine lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Eine biochemische Charakterisierung der Physarum-Proteine cap42(a), cap42(b), Fragmin und Aktin erfolgte durch Bestimmung der Molekulargewichte, isoelektrischen Punkte, sowie durch limitierte Proteasespaltungen. Auf Grund ihres Verhaltens konnten die vier Proteine in eine Untergruppe A (cap42(b)/Aktin: MG 42 kd; IEP 5,4) und eine Untergruppe B (cap42(a)/Fragmin: MG 42 kd; IEP 6,1) eingeteilt werden.
2. Es konnten polyklonale Antikörper, die jeweils gegen die einzelnen vier Proteine gerichtet sind, gewonnen werden. Der Nachweis der Antikörperspezifität erfolgte in Immunoblotanalysen. In Physarum-Zellhomogenaten wurden ausschließlich Peptide des Molekulargewichts 42 kd erkannt.

In Festphasenradioimmunoassay konnten Kreuzreaktivitäten der 42 kD Physarum Proteine mit den Antikörpern nachgewiesen werden. Folglich scheint eine Strukturhomologie der F-Aktin-Cappingproteine untereinander und zum Aktin vorzuliegen.

3. Da im Physarum-Genom mehrere Aktin Gene nachgewiesen worden sind (Schedl und Dove, 1982), wurde untersucht, ob eventuell eines dieser Gene für das Aktin-ähnliche Protein cap42(b) kodiert, oder ob zusätzliche Aktin-ähnliche Sequenzen in der genomischen Physarum-DNA gefunden werden können.

a) Isolierung einer homologen Physarum Aktin-c-DNA

Es konnte eine Aktin-c-DNA aus einer LAMBDA gt11-Physarum-c-DNA-Genbank mit Hilfe einer heterologen Seeigel-Aktin-DNA isoliert werden. Eine Sequenzanalyse ergab, daß diese c-DNA den gesamten kodierenden Bereich eines Aktin Gens zusammen mit 5'-(10Bp) und 3'-(200Bp) flankierenden Sequenzen enthielt.

b) Klonierung und Teilsequenzierung einer Aktin-ähnlichen Sequenz aus Physarum

In Southernblotanalysen genomischer EcoRI-geschnittener Physarum-DNA konnte mit Hilfe der homologen Physarum-Aktin-c-DNA und unter niedrigen Stringenzbedingungen eine zusätzliche 4 kBp große bislang noch nicht beschriebene Bande identifiziert werden.

Nach Größenfraktionierung EcoRI-geschnittener Physarum-DNA wurde eine Unterbibliothek von DNA-Fragmenten des 4 kBp-Bereichs im LAMBDA gt10-Vektor angelegt. Mit Hilfe der Physarum-Aktin-c-DNA konnten positive rekombinante LAMBDA gt10-Klone isoliert werden. Ein 900 Bp-Teilfragment der klonierten 4 kBp-Bande, welche die zusätzlich identifizierte Aktin-ähnliche Sequenz beinhaltete, wurde in den M13-Phagen

subkloniert und ansequenziert.

Es konnte gezeigt werden, daß dieses DNA-Fragment die 5'-stromaufwärts flankierende Region mit den für die Transkription wichtigen Regulationssequenzen (TATA-Box, CAAT-Stelle) und die ersten sechs Kodons eines Physarum- Aktingens enthielt.

Eine komplette Sequenzierung des zusätzlich identifizierten Aktin-DNA-Fragments und ihr anschließender Vergleich mit dem bereits sequenzierten Physarum-Aktingen ardA konnte aus Gründen der Instabilität klonierter genomischer Physarum-DNA noch nicht durchgeführt werden.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Aldrich, H.C. und Daniel, J.W., eds. (1982). In: Cell Biology of Physarum and Didymium, Vol. 1, Academic press.
- Allera, A., Beck, R. und Wohlfarth-Bottermann, K.-E. (1971). Cytobiologie, Band 4, pp. 437-449.
- Biggin, M.D., Gibson, T.J., und Hong, G.F. (1983). PNAS, Vol. 80, pp. 3963-3965
- Birchmeier, W. (1984). TIBS, April, pp. 192-195.
- Collins, J., Volckaert, G. und Nevers, P. (1982) Gene, Vol. 19, pp 139-146
- Cooke, D.J. und Dee, J. (1975). Genet. Res., Camb., Vol. 2, pp. 175-187.
- Daniel, J.W. und Baldwin, H.H. (1964). In: Methods in Cell Physiology, ed. Prescott, D.M., Academic press, New York, Vol. 1, pp. 9-41.
- Durica, D.S., Schloss, J.A. und Crain, W.R. (1980). PNAS, Vol. 77, pp. 5683-5687.
- Dustin, P. (1984). In: Microtubules, Kap. 6+7, Springer-Verlag.
- Firtel, R.A., Timm, R., Kimmel, A. und McKeown, A. (1979). PNAS, Vol. 76, pp. 6206-6210.
- Frischauf, A.-M., Lehrach, H., Poustka, A. und Murray, N. (1983). J. Mol. Biol., Vol. 170, pp. 827-842.
- Fyrberg, E.A., Bond, B.J., Hershey, N.D., Mixter, K. und Davidson, N. (1981). Cell, Vol. 24, pp. 107-116.
- Gautsch, J.W. und Wulff, D.L. (1974). Genetics, Vol. 77, pp. 435-448.
- Geiger, B. und Singer, S.J. (1980). PNAS, Vol. 77, pp. 4769-4773.
- Gilbert, W. (1978) Nature, Vol. 271, p 501
- Goldman, R., Pollard, T. und Rosenbaum, J., eds. (1976). Cell Motility, pp. 1-1376, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hardman, N., Jack, P.L., Brown, A.J.P. und McLachlan, A. (1979). Eur. J. Biochem., Vol. 94, pp. 179-187.
- Hasegawa, T., Takahashi, S., Hayashi, H. und Hatano, S. (1980). Biochemistry, Vol. 19, pp. 2677-2683.
- Hinssen, H. (1981a). Eur. J. of Cell Biol., Vol. 23, pp. 225-233.
- Hinssen, H. (1981b). Eur. J. of Cell Biol., Vol. 23, pp. 234-240.
- Holmes, D.S. und Quigley, M. (1981). Anal. Biochem., Vol. 144, pp. 193-197.

- Huxley, H.E. (1963). *J. Mol. Biol.*, Vol. 7, p. 281.
- Imhof, B.A., Marti, U., Boller, K., Frank, H. und Birchmeier, W. (1983). *Exp. Cell. Res.*, Vol. 145, pp. 199-207.
- Isenberg, G., Aebi, U. und Pollard, T.D. (1980). *Nature*, Vol. 288, pp. 455-459.
- Isenberg, G., Leonard, K. und Jockusch, B.M. (1982). *J. Mol. Biol.*, Vol. 158, pp. 231-249.
- Isenberg, G., Hinssen, H., Knoerzer, W., Maruta, H., Ohnheiser, R. und Schleicher, M. (1985). In: *Cell Motility, Mechanism and Regulation*, University Tokyo Press, Sato, H. und Hatano, S., eds.
- Jeffery, W. (1982). In: *Cell Biology of Physarum and Didymium*, Vol. 2, Chap. 18, pp. 290-300, Academic Press.
- Karlik, C.C., Coutu, M.D. und Fyrberg, E.A. (1984). *Cell*, Vol. 38, pp. 711-719.
- Karn, J., Brenner, S., Barnett, L. und Cesareni, G. (1980). *PNAS*, Vol. 77, No. 9, pp. 5172-5176.
- Kimmel, A.R. und Firtel, R.A. (1982). In: *The Development of Dictyostelium discoideum*, Loomis, W.F., ed., Academic Press, New York.
- Kindle, K.L. und Firtel, R.A. (1978). *Cell*, Vol. 15, pp. 763-778.
- Korn, E.D. (1978). *PNAS*, Vol. 75, pp. 588-599.
- Laemmli, U.K. (1970). *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685.
- Leach, D.R.F. und Stahl, F.W. (1983). *Nature*, Vol. 305, pp. 448-451.
- Lewin, Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Forv, A.C., und Randall, R.J. (1951). *J. B. C.*, Vol. 193, pp. 265-275.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Maruta, H., Isenberg, G., Schreckenbach, T., Hallmann, R., Risse, G., Shibayama, T. und Hesse, J. (1983a). *J. Biol. C.*, Vol. 258, No. 16, pp. 10144-10150.
- Maruta, H. und Isenberg, G. (1983b). *J. B. C.*, Vol. 258, N. 16, pp. 10151-10158.
- Maruta, H., Baltes, W., Knoerzer, W. und Isenberg, G. (1983c). *J. Cell. Biol.*, Vol. 97, p. 373a.
- Maruta, H. und Isenberg, G. (1984a). *J. B. C.*, Vol. 259, No. 8, pp. 5208-5213.
- Maruta, H., Knoerzer, W., Hinssen, H. und Isenberg, G. (1984b). *Nature*, Vol. 312, pp. 424-427.

- Matsudaira, P., Jakes, R. und Walker, J.E. (1985). *Nature*, Vol. 315, pp. 248-250.
- McKeown, M. und Firtel, R.A. (1981). *J. Mol. Biol.*, Vol. 151, pp. 593-606.
- Mohberg, J. und Rusch, H.P. (1971). *Exp. Cell. Res.*, Vol. 66, pp. 305-316.
- Monteiro, M.M. und Cox, R.A. (1986) MGG, in press
- Morrison, D.A. (1979). *Meth. in Enzymology*, Vol 68, pp. 326-331.
- Murray, N.E., Brammar, W.J. und Murray, K. (1977) *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 150, pp 53-61
- Murray, M.G., Kennard, W.C., Drong, R.F., und Slighton, J.L. (1984), *Gene*, Vol. 30, 3 pp 237-240
- Nader, W.F., Edling, T.D., Huettermann, A. und Sauer, H.W. (1985). *PNAS*, Vol. 82, pp. 2698-2702.
- Nellen, W. und Gallwitz, D. (1982). *J. Mol. Biol.*, Vol. 159 pp 1-18
- Nellen, W., Silan, C. und Firtel, R.A. (1984). *Mol. Cell. Biol.*, Vol.4, pp 2890-2898
- Nader, W.F., Isenberg, G. und Sauer, H.W. (1986). *EMBO*, submitted.
- O-Farell, P.H. (1975). *J. B. C.*, Vol. 250, pp. 4007-4021.
- Osborn, M. und Weber, K. (1982). *Cell*, Vol. 31, pp. 303-306.
- Petu, W.H. und Wyman, A.R. (1985) *Genetics*, Vol. 110, p 59
- Pollard, T.D. und Mooseker, M.S. (1981). *J. Cell. Biol.*, Vol. 88, pp. 654-659.
- Quax, W., Egberts, W.V., Hendriks, W., Quax-Jenken, K. und Bloemendahl, H. (1983). *Cell*, Vol. 35, pp. 215-223.
- Remedios, C.G. und Barden, J.A. (1983). In: *Aktin: Structure and function in Muscle and Non-Muscle cells*, Academic Press.
- Rigby, P.W., Dieckmann, M., Rhodes, C. und Berg, P. (1977). *J. Mol. Biol.*, Vol. 113, pp. 237-251.
- Romans, P. und Firtel, R.A. (1985). *J. Mol. Biol.*, Vol. 186, pp. 321-335.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). *PNAS*, Vol. 74, pp. 5463-5467.
- Sauer, H.W. (1982). *Developmental Biology of Physarum*, Cambridge University Press.
- Schedl, T. und Dove, W.F. (1982). *J. Mol. Biol.*, Vol. 160, pp. 41-57.

- Scott, J.A. (1984). *J. theor. Biol.*, Vol. 106, pp. 183-188.
- Shibayama, T., Nakaya, K. und Nakamura, Y. (1985). *J. Biochem.*, Vol. 98, pp. 57-62.
- Smith, G.R. (1983). In: *Lambda II*, ed. Hendrix. R.W., Roberts, J.W., Stahl, F.W. und Weisberg, R.A., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 175-209.
- Southern, E.M. (1975). *J. Mol. Biol.*, Vol. 98, pp. 503-517.
- Taylor, J.M. und Tse, T.P.H. (1976). *J. Biol. chem.*, Vol 251, pp 7461-7467
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). *PNAS*, Vol. 76, pp. 4350-4354.
- Vandekerckhove, J. und Weber, K. (1978a). *Nature*, Vol. 276, pp. 720-721.
- Vandekerckhove, J. und Weber, K. (1978b). *PNAS*, Vol. 75, pp. 1106-1110.
- Vandekerckhove, J. und Weber, K. (1978c). *Eur. J. Biochem.*, Vol. 90, pp. 451-462.
- Vandekerckhove, J. und Weber, K. (1979). *Differentiation*, Vol. 14, pp. 123-133.
- Weeds, A. (1982). *Nature*, Vol. 296, pp. 811-815.
- Wegner, A. und Isenberg, G. (1983). *PNAS*, Vol 80, pp. 4922-4925
- Werenskiold, A.-K., Grauvogl, C. und Schreckenbach, T. (1985). *EMBO J.*, in press.
- Wohlfahrth-Bottermann, K.E. (1979). *J. Exp. Biol.*, Vol. 81, pp. 15-32.
- Wyman, A.R., Wolfe, L.B. und Botstein, D. (1985) *PNAS*, Vol. 82, pp 2880-2884
- Young, R.A. und Davis, R.W. (1983a). *PNAS*, Vol. 80, pp. 1194-1198.
- Young, R.A. und Davis, R.W. (1983b). *Science*, Vol. 222, pp. 778-782.

Lebenslauf

Name	Wiebke Knoerzer
geb. am	14. März 1956 in Hamburg
Eltern	Dr. Gerhard Knoerzer, Physiker Ursula Knoerzer, geb. Münstermann, Apothekerin
1962-1964	Volksschule Kahl, Landkreis Alzenau
1964-1966	Volksschule Gundremmingen, Landkreis Günzburg
1966-1970	Dossenberger-Gymnasium (neusprachlich), Günzburg
1970-1975	Elsa-Brandström-Gymnasium (neusprachlich), München
Mai 1975	Abitur
1975-1976	Studium der Physik und Mathematik für Lehramt/ Gymnasium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1976-1981	Studium der Biologie/Diplom an der Ludwig- Maximilians-Universität München
Mai 1979	Diplom-Vorprüfung
November 1981	Diplom-Hauptprüfung
Feb. 1982-	
Dez. 1982	Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität, München
März 1983-	
Juli 1986	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Martinsried bei München



